



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MOLECULAR**

GABRIELA SPOLTI DA SILVA

**USO DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO
(PRRs) NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

**BRASÍLIA, DF
2018**

GABRIELA SPOLTI DA SILVA

**USO DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO
(PRRs) NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, na faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília, DF

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, aos meus pais Maria Augusta Spolti e Salatiel Oliveira da Silva. Pelo apoio, companheirismo, por serem meus amigos, por me motivarem e tornarem meus objetivos possíveis.

Agradeço à minha orientadora Anamélia Bocca por todo o incentivo, conhecimento, conselhos e amizade.

Agradeço à equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada. Em especial, agradeço à Mariana, ao Pedro e à Dawanne, que tornaram esse trabalho comigo e sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Agradeço aos amigos que acompanharam minha trajetória na pesquisa. Que sabem que não foi fácil e que sempre me motivaram a ir em frente.

Agradeço imensamente aos meus familiares por todo amor e compreensão.

Agradeço à Fernanda Guilhelmelli Costa e ao Marco Antônio de Oliveira, do laboratório Maristela Oliveira de Azevedo, por me ensinarem uma técnica essencial ao meu trabalho, a RT-PCR.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, adquirida pela inalação de propágulos da forma miceliana, presentes no solo. O desenvolvimento da doença depende de fatores do fungo, como mecanismos de evasão, além de fatores do hospedeiro. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa com predominância de linfócitos T auxiliares do tipo 1 é considerada adequada e associada a resistência à PCM em modelos murinos e em humanos. A resposta adaptativa é iniciada e direcionada principalmente por células dendríticas (DCs) após o reconhecimento de padrões moleculares de patógenos. Assim, este trabalho avalia a capacidade imunomodulatória de dois agonistas de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) sobre DCs. Para isso DCs foram infectadas com *P. brasiliensis* e tratadas com agonistas de PRRs Zymosan e Pam3csk4, que são respectivamente ligantes de Dectina-1/TLR-2 e TLR-2. Observou-se que, em geral, o tratamento induz a uma modulação de diversas atividades de DCs infectadas com o fungo. Foi observado o aumento da produção de citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , a indução significativa da maturação das DCs, que em geral é inibida pelo *P. brasiliensis*. Além disso, o tratamento induziu o desenvolvimento de um perfil de citocinas associadas a resposta com predominância de linfócitos Th1. Ainda foi observada a capacidade do fungo de inibir a produção de IL-12p70 por DCs pela redução da transcrição do gene *il12a*, que codifica a subunidade específica p35 dessa citocina. Finalmente, a administração de zymosan em camundongos infectados pelo *P. brasiliensis* resultou na diminuição significativa da carga fúngica.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; células dendríticas, agonistas de PRRs, IL-12, IFN- γ

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. It is acquired by the inhalation of propagules of the mycelial form from the soil. The development of the disease depends on fungus features such as evasion mechanisms, and of host factors. In this context, the development of an adaptive immune response with a predominance of type 1 helper T lymphocytes is considered adequate and associated with resistance to PCM in murine models and in humans. The adaptive response is initiated and directed mainly by dendritic cells (DCs) after the recognition of pathogens molecular patterns. In this context this work evaluates the immunomodulatory capacity of three pattern recognition receptor (PRR) agonists on DCs during interaction with *P. brasiliensis*. DCs were infected with *P. brasiliensis* and treated with PRRs agonists Zymosan, Zymosan Depleted and Pam3csk4, which are bound respectively to Dectin-1/TLR-2, only Dectin-1 and only to TLR-2. It was observed that, in general, the treatment induces a modulation of various functions of fungal infected DCs. It was observed increased production of cytokines, such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β and significant induction of maturation DCs, which in general is reduced by *P. brasiliensis*. Furthermore, the treatment induced the development of a cytokines profile associated with Th1 response predominance of lymphocytes. Furthermore, this work demonstrated the capacity of the fungus to inhibit IL-12p70 production by DCs, via reduction of the *il12a* gene transcription that encodes the specific p35 subunit of this cytokine. Lastly, the administration of zymosan in mice infected with *P. brasiliensis* led to a significant reduction of the fungal burden in the lung and spleen.

Key-words: *Paracoccidioides brasiliensis*, dendritic cells, PRRs' agonists, IL-12, IFN- γ

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.: Mapa das regiões endêmicas de PCM nas Américas do Sul e Central.

Figura 2: : Análise morfológica do *Paracoccidioides* em microscopia eletrônica.

Figura 3. Subpopulações de linfócitos T CD4+ em infecções fúngicas.

Figura 4. Diferentes estratégias de estímulo de células dendríticas.

Figura 5. Dosagem das citocinas TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-12p70 (D) e IL-12p40 (E) do sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectados ou não com *P. brasiliensis* (Pb).

Figura 6. Produção de IL-12p70 na presença de LPS.

Figura 7. . Detecção de IL-12p70 no sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectadas com *P. brasiliensis* (Pb).

Figura 8. . Dosagem de IL12p70 no sobrenadante de culturas de BMDCs WT (tipo selvagem), Dec-1 KO (deficiente para dectina-1), Dec-2 KO (deficiente para dectina-2), Dec-3 KO (deficiente para dectina-3), TLR-2KO (deficiente para TLR2), TLR4-KO (deficiente para TLR4) , WT + Anti-mincle.

Figura 9. Histogramas representativos da análise de expressão dos marcadores de maturação CD80 (A) e CD86 (B) de BMDC (DC) infectadas por *P. brasiliensis* (Pb) e tratadas ou não com agonistas de PRRs Zymosan (Zymo; 20 ug/ml) ou PAM3CSK4 (PAM; 300ng/ml) por 24h.

Figura 10. Quantificação de IFN- γ , IL-13 e IL-17 no sobrenadante de co-culturas de BMDC (DC) infectadas por *P. brasiliensis* (Pb) e esplenócitos (Esp) enriquecidos de linfócitos T tratados com agonistas de PRRs Zymosan (Zymo; 20 ug/ml) ou PAM3CSK4 (PAM; 300ng/ml).

Figura 11. Quantificação de IL-12, IL-18 e IL-27 no sobrenadante de co-culturas de BMDC (DC) infectadas por *P. brasiliensis* (Pb) e esplenócitos (Esp) enriquecidos de linfócitos T tratados com agonistas de PRRs.

Figura 12. . Fluxograma do experimento *in vivo* realizado em camundongos C57BL6.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores para genes murinos utilizados nos ensaios de RT-qPCR

LISTA DE ABREVIações

APC	Células apresentadoras de antígenos
BMDC	Células dendríticas provenientes de medula óssea
CLR	Receptores de lectina do tipo C
DC	Célula Dendrítica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRF1	Fator regulatório de interferon
kDa	Quilodalton
KO	Que não expressa
LPS	Lipopolissacarídeo
NLRP3	Receptor do tipo NOD3
nm	Nanômetro
NK	Células assassinas naturais
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCM	Paracoccidiodomicose
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
TLR	Receptor do tipo toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Th	Linfócito T auxiliar
UFC	Unidades formadoras de colônias
WT	Tipo selvagem

SUMÁRIO

1 – Introdução.....	12
1.1 – A Paracoccidioidomicose (PCM) e seu agente etiológico <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	12
1.2 – O reconhecimento fúngico pelo sistema imune.....	15
1.3 – Células dendríticas e sua influência na imunidade adaptativa	16
1.4 – A importância dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs)	18
1.5 – Terapias alternativas na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	21
2 – Objetivos	24
2.1 - Objetivo geral	24
2.2 – Objetivos específicos	24
3 - Materiais e Métodos	25
3.1 – Animais	25
3.2 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	25
3.3 - Reagentes.....	25
3.4 - Obtenção de Células Dendríticas	25
3.5 – Infecção das células dendríticas com <i>P. brasiliensis</i>	26
3.6 - Dosagem de citocinas da cultura de células dendríticas infectadas	27
3.7 - Co-cultivo de células dendríticas com esplenócitos	27
3.8 - Determinação dos níveis de transcritos de IL-12p35	28
3.9 - Citometria de Fluxo	29
3.10 - Estímulo de DCs para tratamento <i>in vivo</i>	30
3.11 – Infecção/tratamento intranasal de camundongos com BMDCs estimuladas por Zymosan	30
3.12 - Análise estatística.....	30
4 - Resultados.....	32
4.1 – Agonistas de PRRs incrementam a produção de citocinas pró- inflamatórias <i>in vitro</i> por BMDCs infectadas por <i>P. brasiliensis</i> com exceção de IL-12p70	32
4.2– O processo inibitório exercido sobre IL-12p70 se dá na transcrição de sua subunidade p35.....	34
4.3 - A inibição de IL-12p70 em BMDCs infectados por <i>P. brasiliensis</i> é condicionada ao reconhecimento direto com o fungo	35

4.4- Agonistas de PRRs estimulam a maturação de BMDCs infectadas por <i>P. brasiliensis</i>	38
4.5 – Os agonistas de PRRs modulam o perfil da população de linfócitos T auxiliares induzidos por BMDC infectadas por <i>P. brasiliensis</i>	39
4.6 – IL-18 e IL-27 são capazes de induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T auxiliares, mesmo com a inibição induzida de IL-12p70 em BMDC infectadas por <i>P. brasiliensis</i>	41
4.7 – O tratamento com BMDCs estimuladas por Zymosan reduz a carga fúngica em pulmão e baço de camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	42
5 – Discussão	45
6 - Conclusão	53
7 – Referências Bibliográficas	54
8 - Anexo 1	66

1 – Introdução

1.1 – A Paracoccidioidomicose (PCM) e seu agente etiológico *Paracoccidioides brasiliensis*

A PCM é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, presente desde a Argentina até o México, e é causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. No Brasil, esta é a micose sistêmica que causa maior mortalidade e a oitava doença crônica/recorrente fúngica ou parasitária mais frequente. Essa doença não é de notificação compulsória, fato que favorece que ela seja negligenciada e subnotificada. Além disso, as regiões endêmicas geralmente têm um sistema precário de diagnóstico (COLOMBO *et al*, 2011; COUTINHO *et al*, 2015).

Este ponto é de extrema relevância, pois a PCM pode ser facilmente confundida com tuberculose (por possuírem sintomas e perfis de imagens de Raio-X semelhantes), requerendo diagnóstico diferencial. Aproximadamente 14% dos pacientes com PCM possuem de fato coinfeção com *Mycobacterium tuberculosis*, o que dificulta a identificação de ambos os patógenos (COUTINHO *et al*, 2015). Mortes por PCM, em geral, ocorrem pelas lesões disseminadas, insuficiência respiratória e complicações provenientes do longo tempo de uso de antifúngicos (PANIAGO, 2003; VIEIRA *et al*, 2014; MARTINEZ, 2017).

O Brasil é o centro endêmico, contando com 80% dos casos relatados, sendo os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso os mais afetados. Além desses estados, na região Norte, notadamente em Rondônia, com a abertura de novas fronteiras agrícolas também contribui para o atual panorama da micose (Figura 1). Acometendo principalmente a população rural, devido possivelmente ao contato contínuo com o habitat do fungo, que é o solo (COUTINHO *et al*, 2015; MARTINEZ, 2017).

Estima-se que ocorreram 168 mortes por ano por PCM no Brasil entre 1996 e 2006. Como a letalidade esperada da doença varia de 3% a 5%, o número de novos casos por ano no Brasil durante esse período variou entre 3360 e 56000 (MARTINEZ, 2017). Entre os anos de 1980 e 1999 na região de Ribeirão Preto (SP) a incidência da PCM variou entre 1.5 e 3.7 casos a cada 100.000 habitantes/ano, já em Rondônia, no norte do país, entre os anos 1997 e 2012, a incidência foi, em

média, de 9,4 casos a cada 100.000 habitantes/ano; contudo, há alguns municípios desse estado onde a incidência foi próxima de 40 casos a cada 100.000 habitantes/ano (RODRIGUES *et al*, 2011; VIEIRA *et al*, 2014; MARTINEZ,2017).

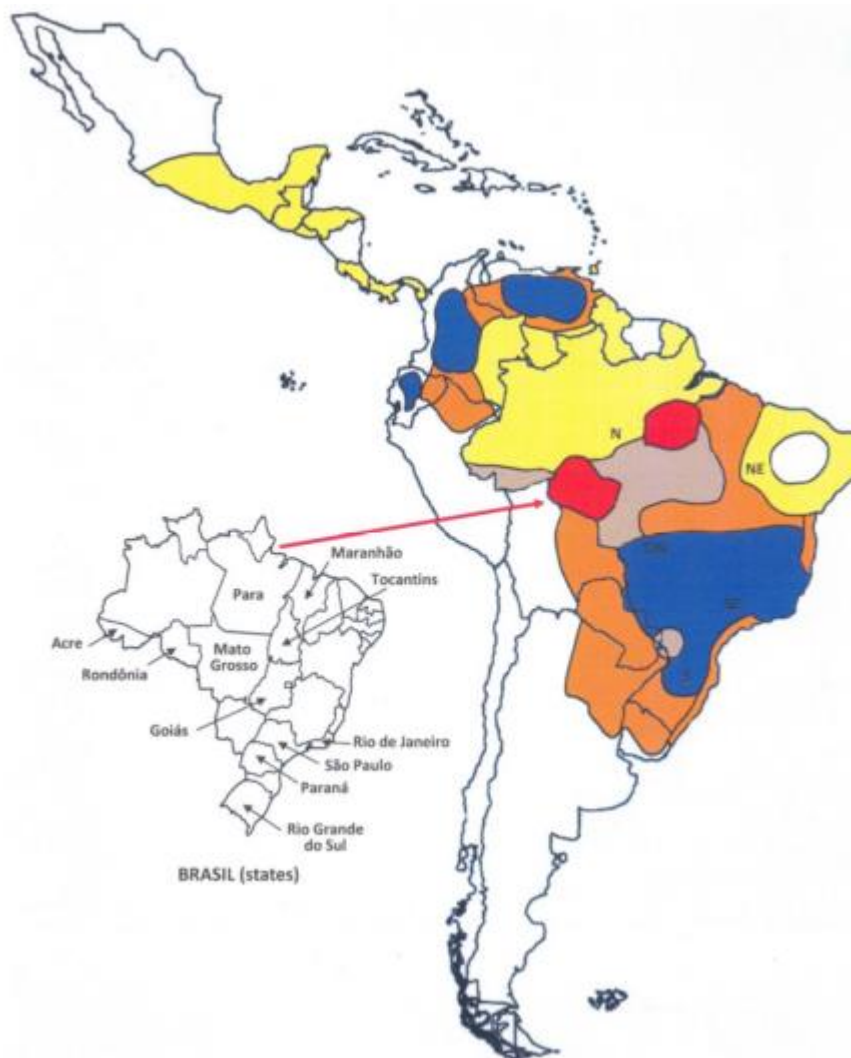


Figura 1.: Mapa das regiões endêmicas de PCM nas Américas do Sul e Central. Áreas amarelas significam baixa incidência; áreas laranjas são de moderada incidência; áreas bege são locais com recente aumento de endemia; áreas vermelhas são de alta incidência e áreas azuis são as primeiras regiões que tiveram a incidência considerada alta. (MARTINEZ, 2017).

O *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico presente no solo. Ele existe na forma de micélio à temperatura ambiente, produzindo conídios que agem como propágulos infecciosos. Uma vez que esses propágulos são inalados pelo hospedeiro, o fungo consegue atingir os pulmões, onde ele irá mudar para a forma de levedura devido à temperatura de 37°C. Essa mudança pode ser reproduzida *in vitro* como mostrado na Figura 2 (DA SILVA *et al*,1999).

Essa transição é indispensável para que o fungo se estabeleça no pulmão, pois acontecem alterações metabólicas, fisiológicas e principalmente em sua parede celular. Há o aumento da quitina e a mudança da proporção dos polímeros de glicose de β -1,3-glicana e α -1,3-glicana (que passa a ser sintetizada e se localiza acima da β -1,3-glicana, que é mais imunoestimulatória) (BORGES-WALMSLEY *et al*, 2002).

Além da mudança estrutural da parede celular, outro aspecto importante para o desenvolvimento fúngico é sua capacidade de adesão às células do hospedeiro. Já foi observado que a principal proteína imunogênica do *P. brasiliensis*, gp43, que age como fator de virulência, participa do processo de degradação de citoqueratinas, para a perda da característica filamentosa das células epiteliais do pulmão, facilitando a invasão do fungo. (PUCCIA *et al*, 2011; DE OLIVEIRA, *et al*, 2015)

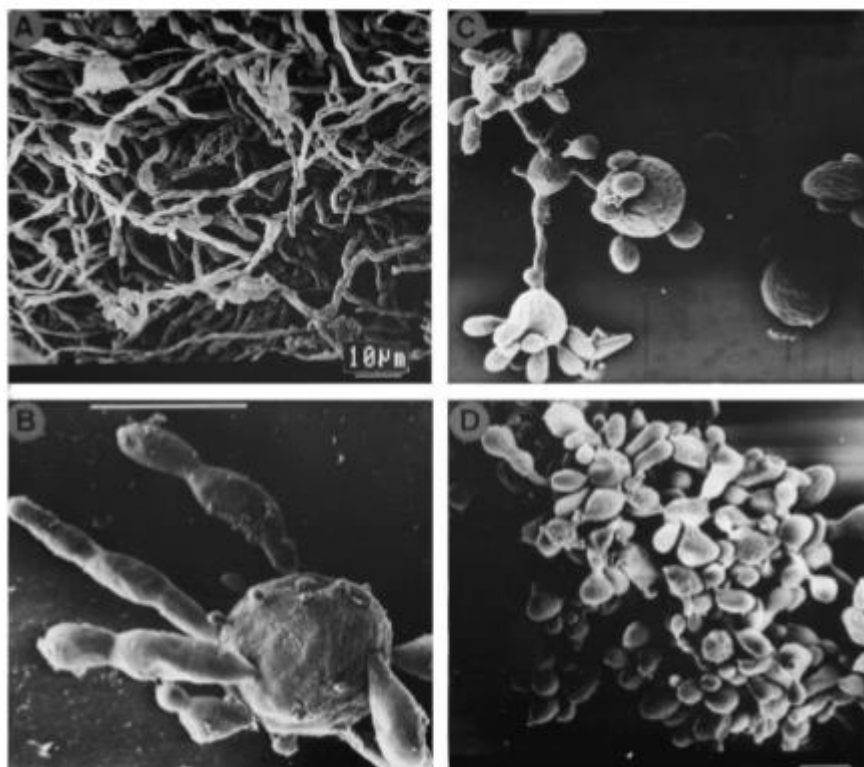


Figura 2: Análise morfológica do *Paracoccidioides* em microscopia eletrônica mostrando a transição da forma de micélio (A) para levedura (D) em 26°C e 36°, respectivamente. (B) e (C) mostram as mudanças morfológicas durante essa transição (DA SILVA *et al*, 1999).

Um fato interessante da PCM é que ela acomete muito mais homens (82%) que mulheres. Isso se deve a duas razões: (1) fator de exposição, por ser um fungo

encontrado principalmente em zona rural as pessoas que trabalham diretamente no campo estão mais expostas e em sua maioria são homens; (2) estrógenos, o fator hormonal presente nas mulheres dificulta a transição da forma micelar do fungo para levedura, o que dificulta por sua vez, o desenvolvimento da doença (BOCCA *et al.*, 2013; MENDES *et al.*, 2017).

A PCM acomete principalmente indivíduos imunocompetentes e a susceptibilidade a essa infecção fúngica é bastante variável, pois a defesa imunológica é complexa e multifatorial. Algumas pessoas podem não desenvolver a doença e permanecer ao longo da vida assintomáticas. Tal fenômeno geralmente está associado a uma formação adequada de granuloma no pulmão, liberação de citocinas pró inflamatórias (como IL-1 β , IL-12, IL-6 e IFN- γ) e produção de óxido nítrico, características que inibem a disseminação fúngica (CALICH *et al.*, 2008; DE CASTRO *et al.*, 2013).

Por outro lado, há pacientes que acabam desenvolvendo a doença, o que pode ocorrer de duas formas: aguda ou crônica. A forma aguda da PCM, também conhecida como juvenil, é mais severa, podendo ocorrer linfonodomegalia, hepatoesplenomegalia, sintomas digestivos, cutâneos e osteoauriculares (BOCCA *et al.*, 2013; WANKE & AIDÊ, 2009; ROMANI, 2011). A forma crônica leva de meses a anos para se desenvolver e é o perfil de cerca de 90% dos casos (MENDES *et al.*, 2017). É iniciada por lesões pulmonares que podem disseminar para outros órgãos e tecidos, como mucosas (principalmente da faringe e laringe), pele, linfonodos e glândulas adrenais. O fígado, baço e sistema nervoso central também podem ser acometidos se não houver tratamento. As formas aguda e crônica estão relacionadas com a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-10 e a geração de uma resposta adaptativa com predominância de linfócitos Th2 (CALICH *et al.*, 2008).

1.2 – O reconhecimento fúngico pelo sistema imune

A ativação do sistema imunológico se inicia com o reconhecimento do microrganismo invasor. Tal processo ocorre devido ao fato de as células imunes possuírem receptores com a função de se ligarem a determinadas estruturas que são estranhas ao hospedeiro. Esses receptores são chamados de receptores de

reconhecimento padrão (PRRs, *pattern recognition receptors*) e se ligam a antígenos do microrganismo chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) (ROMANI, 2011).

Em caso de infecções fúngicas, os principais PAMPs são os componentes da parede celular: quitina, β -1,3-glicana e manana, enquanto os principais PRRs são pertencentes às classes receptores de lectina do tipo C (CLR, *C-type lectin receptors*) e receptores do tipo toll, (TLR, *Toll like receptors*). Esse processo de reconhecimento inicia a chamada resposta imune inata, que é principalmente mediada por atividade celular, envolvendo processos inflamatórios. Neutrófilos, monócitos, macrófagos são as principais células que reconhecem, fagocitam e medeiam a eliminação do microrganismo, enquanto células dendríticas fazem o processamento e apresentação antigênica, iniciando a chamada imunidade adaptativa, basicamente mediada por linfócitos ativados que produzem citocinas, quimiocinas e anticorpos para a eliminação do patógeno (ROMANI, 2011; KUMAR, KAWAI & AKIRA, 2011; ERWIG & GOW, 2016).

1.3 – Células dendríticas e sua influência na imunidade adaptativa

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos profissionais (APC, *antigen presenting cells*). Imaturas, elas residem nos tecidos até reconhecerem um microrganismo para fazer o reconhecimento pelos seus PRRs, internaliza-lo e processa-lo. Quando o fazem, migram para os linfonodos, para realizar a apresentação do antígeno aos linfócitos T virgens. Assim, as DCs são tidas como um elo entre as imunidades inata e adaptativa (BANCHEREAU *et al*, 2000).

O processo de migração para o linfonodo é concomitante a outro processo imprescindível para essa célula: sua maturação. Mudanças importantes ocorrem nas DCs para que a apresentação do antígeno seja realizada: diminuição da sua capacidade de endocitose e fagocitose (pela diminuição dos receptores com essa função); aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, como CD11b, CD40, CD58, CD80 e CD86, além do aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) de classe II, que é a

molécula que realizará a apresentação do antígeno processado para o linfócito T CD4⁺ virgem (BANCHEREAU *et al*, 2000; WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012).

A proliferação e a polarização das diferentes subpopulações de linfócitos T dependem do tipo de estímulo, do processamento, da apresentação de antígenos e consequentemente das citocinas secretadas pelas DCs maduras (SAID & WEINDL, 2015). Dentre as subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th), Th1 e Th2 são dois perfis diferentes, adequados para patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente. Essas populações estão associadas a padrões de citocinas distintos. A produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-18 está relacionada com a predominância de linfócitos Th1 e a consequente produção de IFN- γ , que é uma citocina importante para regular a atividade das imunidades inata e adaptativa e um potente ativador da função microbicida de fagócitos, sendo essencial para a resistência contra bactérias, fungos e parasitas intracelulares. Já a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13 está relacionada com a predominância de linfócitos Th2 (TRINCHIERI, 2013; CALICH *et al*, 2008). A figura 3 ilustra a produção de citocinas por células dendríticas e sua capacidade de induzir o desenvolvimento de diferentes subpopulações de linfócitos T frente a diferentes infecções fúngicas (ROMANI, 2011).

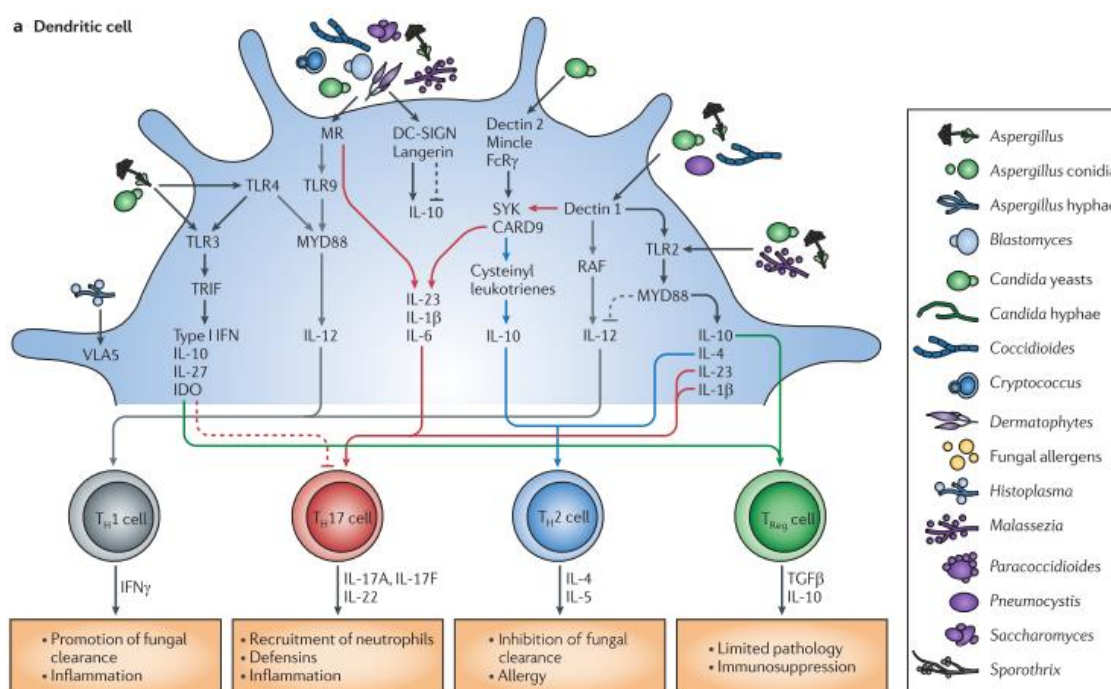


Figura 3: Subpopulações de linfócitos T CD4+ em infecções fúngicas. A capacidade das células dendríticas responderem à diferentes combinações de PRRs-PAMPs com a ativação de diferentes vias de sinalização, levando a produção de diversas citocinas distintas, que culminarão na indução de um tipo predominante de linfócitos T ou regulatórios (Adaptado de: ROMANI, 2011)

Na infecção com *P. brasiliensis*, sabe-se que a resposta adequada ao hospedeiro tem o envolvimento de IL-12, para geração do perfil de linfócitos Th1 e produção de IFN- γ e de IL-1 β para auxiliar no controle do crescimento intracelular do fungo, além da diminuição da produção de citocinas relacionadas ao desenvolvimento de linfócitos Th2 (THIND, TABORDA & NOSANCHUK, 2015). A caracterização da infecção com *P. brasiliensis* em humanos também mostra que a resistência está relacionada com a resposta predominante de linfócitos Th1, enquanto a susceptibilidade à doença possui uma predominância de linfócitos Th2, induzida por IL-4 e IL-13, principalmente (DE CASTRO *et al*, 2013).

Contudo, já foi descrito que o *P. brasiliensis* é capaz de comprometer a função de DCs, reduzindo seu processo de maturação, por reduzir a expressão de MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86, além de inibir drasticamente que essas células produzam IL-12, essencial para a indução da produção de linfócitos Th1 (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004). Por outro lado, altos níveis IL-10 e TGF- β exercem atividade supressiva na imunidade celular, favorecendo a imunidade humoral e o desenvolvimento da predominância de linfócitos auxiliares reguladores (Treg), que não induzem a ativação de macrófagos (DE CASTRO *et al*, 2013).

1.4 – A importância dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs)

As células do sistema imunológico do hospedeiro expressam receptores de reconhecimento padrão, que reconhecem microrganismos invasores e iniciam determinadas cascatas de sinalização celular, culminando na transcrição de diversos genes a fim de eliminar o patógeno. Estes receptores podem estar localizados na membrana celular ou mesmo no citoplasma e são classificados em diferentes famílias (ROMANI, 2011).

Uma das famílias mais importante para o reconhecimento fúngico é a família CLR. São receptores definidos como proteínas transmembranas, capazes de se ligar a maioria das espécies fúngicas que são patogênicas a humanos. Estão incluídos

nessa família: Dectina-1, Dectina-2, Mincle, ICAM-3, MR (receptor de manose, do inglês manose receptor), entre outros. Dectina-1 é o principal receptor de β -1,3-glicana e induz a produção de citocinas anti e próinflamatórias. Isso ocorre porque esse receptor é capaz de ativar duas vias de sinalização distintas e independentes: SYK/CARD9 e RAF-1. Essas vias podem ter efeitos sinérgicos e tem por finalidade a ativação das vias canônicas e não canônicas do fator de transcrição NF- κ B, que resulta na produção de eicosanoides e citocinas como TNF- α , IL-1 β , entre outras. Esse receptor e suas vias de sinalização são importantes, uma vez que já foi demonstrado que camundongos e humanos que não expressam Dectina-1 ou CARD9 geralmente apresentam susceptibilidade à doenças fúngicas (TAYLOR *et al*, 2007; FERWERDA *et al*, 2009; GLOCKER *et al*, 2009). Especificamente na PCM experimental dectina-1 está associado a resistência ao *P. brasiliensis* por meio da sua atuação em macrófagos e células dendríticas que resulta na indução e expansão de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de IL-17 (LOURES *et al.*, 2014; 2015).

A não expressão de Dectina1 e Dectina-2 está relacionada com a diminuição da resposta Th1 em camundongos, mostrando que há um sinergismo entre os dois receptores (ROBINSON *et al*, 2009). Dectina-2 é expressa por uma variedade de células mielóides, tais como macrófagos e células dendríticas, e a sua expressão é aumentada durante a resposta inflamatória. Dectina-2 está envolvido no reconhecimento de polissacáridos de manose como α -manana, e a sua atividade leva à produção de várias citocinas e quimiocinas, incluindo aquelas pró-inflamatórias relacionadas com linfócitos Th1, Th17 (KERSCHER *et al*, 2013).

Dectina-2 reconhece uma variedade de fungos patogênicos, incluindo *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, e *Cryptococcus neoformans* (SATO *et al*, 2006; MCGREAL *et al*, 2006) e desempenha um papel crítico na defesa do hospedeiro contra a infecção com *C. albicans* por meio de indução a resposta imune mediada por Th17 (SAIJO *et al*, 2010). Recentemente descrito, Dectina-3 é também expresso em fagócitos e reconhece α -mananas. Este PRR participa no reconhecimento dos fungos *C. albicans* e *Fonsecaea prodosoi* (GRAHAM *et al*, 2012; WUTHRICH *et al*, 2015). Importante notar que Dectina-3 forma heterodímeros com Dectina-2 e ainda induz a co-expressão de mincle na superfície celular (ZHU *et al*, 2013). Já o receptor Mincle reconhece estruturas de manose e requer uma

molécula coestimulatória para sua ativação, o FcR γ . De forma semelhante à Dectina, este receptor induz a ativação de NF- κ B pela via de sinalização SYK/CARD9 (ROMANI, 2011; HARDISON & BROWN, 2012; LANDMANN, WÜTHRICH & HOHL, 2012; WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012).

Outra família de PRRs é a TLR. Os receptores pertencentes à essa família são considerados os primeiros sensores de patógenos. TLR1,2,4,5 e 6 são expressos na membrana celular e reconhecem PAMPs de bactérias, fungos e protozoários. Enquanto TLR3,7,8 e 9 são expressos no compartimento de endocitose e reconhecem principalmente ácidos nucleicos (KUMAR, KAWAI & AKIRA, 2011). Após a ligação com antígenos os TLRs se dimerizam e dão início a sua cascata de sinalização, que envolve as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF, que irão produzir citocinas pró-inflamatórias, como IFNs e ativar o complexo NF- κ B (WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012).

TLR2, TLR4 e TLR9 são os principais TLRs envolvidos no reconhecimento de PAMPs, como mananas e DNA fúngico, incluindo aqueles do *P. brasiliensis*. De fato, infecção de macrófagos deficientes em TLR2 resultou em menores índices fagocíticos, diminuição na recuperação de leveduras viáveis e baixos níveis de NO nos sobrenadantes das culturas. Análises *in vivo* mostraram que os camundongos com deficiência de TLR2 e os selvagens apresentaram imunidade humoral semelhante, mas a ausência de TLR2 levou a um aumento da carga fúngica nos pulmões. Apesar dessa diferença, ambas as linhagens de camundongos exibiram taxas equivalentes de mortalidade (LOURES *et al.*, 2009).

O papel de TLR4 na infecção por *P. brasiliensis* também foi avaliado. Macrófagos de camundongos deficientes em TLR4 apresentaram menor capacidade fagocítica, o que parece influenciar a diminuição do número de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* recuperadas após cocultivo. Os macrófagos deficientes secretavam níveis menores de NO e IL-12 mas produziram quantidades equivalentes de TNF- α . Em contraste, a IL-10 foi sintetizada em maiores quantidades por macrófagos sem TLR4 (LOURES *et al.*, 2010).

Ademais, camundongos que não expressam MyD88, essencial na sinalização dos receptores dessa família, tem grande susceptibilidade à infecções com *Candida albicans*, *P. brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (ROMANI, 2011; HARDISON & BROWN, 2012).

Estudos recentes têm mostrado a importância do sinergismo entre receptores dessas duas famílias, o que vem sendo chamado de “cross-talk”. A cooperação entre receptores melhor descrita é entre Dectina-1 e TLR-2 e este é um novo alvo para farmacoterapia e desenvolvimento de vacinas, por aumentar a ativação de NFkB em macrófagos e DCs (LANDMANN, WÜTHRICH & HOHL, 2012) e estimular o aumento da produção de citocinas de interesse, melhorando o perfil de resposta imune (HARDISON & BROWN, 2012).

As vantagens desse “cross-talk” podem ser claramente observadas em alguns estudos. Foi mostrado que a administração exógena de agonistas de TLRs, melhora a resposta imune contra infecção murina por *Fonsecaea pedrosoi*, que naturalmente é reconhecido por receptores do tipo CLR, auxiliando na eliminação do fungo (SOUSA *et al*, 2011). Outro estudo, envolvendo apenas diferentes agonistas de PRRs, mostra que a coestimulação dos receptores Dectina-1 e TLR-2 é muito importante para induzir a produção de IL-12 por células dendríticas humanas de neonatos, citocina não produzida em grande quantidade por essas células em situações normais (LEMOINE *et al*, 2015).

1.5 – Terapias alternativas na infecção por *P. brasiliensis*

A primeira opção de tratamento para PCM é o itraconazol, um antifúngico derivado do imidazol, que age inibindo a síntese do ergosterol, um componente da membrana celular de fungos. Sulfametoxazol e trimetoprima também são utilizados e pacientes hospitalizados geralmente fazem tratamento endovenoso com anfotericina B. É comum que o tratamento dure entre 6 e 18 meses, que haja recidiva da doença, pois a eliminação total do fungo não é garantida ao fim do tratamento (TRAVASSOS & TABORDA, 2012; TABORDA *et al*, 2015). Nesse contexto de baixa eficácia terapêutica, se faz necessária a busca por terapias alternativas de tratamento para essa doença.

Nesse contexto, Existem estudos mostrando a eficácia de vacina profilática e terapêutica em camundongos utilizando um peptídeo derivado da proteína gp43 do fungo, baseada na sua habilidade de estimular a polarização da resposta via linfócitos Th1 (MAGALHÃES *et al*, 2011). De fato, P10, um peptídeo derivado da gp43, induz proteção em camundongos infectados com *P. brasiliensis* por diferentes

vias de infecção (TRAVASSOS & TABORDA, 2012). Além disso, paracoccina recombinante atuou como vacina terapêutica e profilática, quando administrada pela via intranasal (ALEGRE *et al*, 2014).

Uma das principais linhas de pesquisa em vacinas para fungos patogênicos é com a utilização de células dendríticas, uma vez que elas são capazes de iniciar e modular a resposta adaptativa por meio de linfócitos (Figura 4) (ROY & KLEIN, 2012). O uso dessas células previamente estimuladas por diferentes estratégias como vacina ou imunomodulador para infecções fúngicas por *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides posadasii*, entre outros, a fim de modular a resposta imunológica gerada pelo hospedeiro (STUEHLER *et al*, 2011; WUTHRICH *et al*, 2011). De acordo com LIONAKIS, ILIEV & HOHL, 2017, a utilização de β -glicana (principal componente do zymosan) como indutor e modulador da resposta imune é uma das principais estratégias a serem utilizadas.

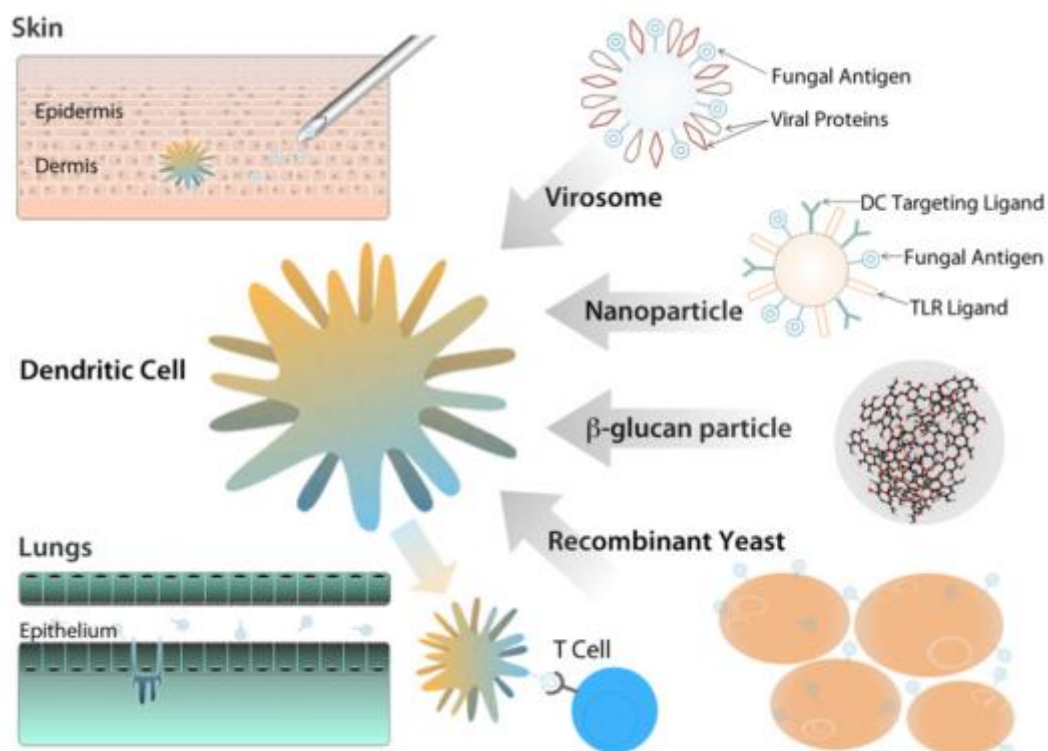


Figura 4.: Diferentes estratégias de estímulo de células dendríticas, para serem utilizadas como vacina por via intradérmica ou intranasal, resultando na apresentação de antígenos e modulação de linfócitos T (ROY & KLEIN, 2012).

Dada a importância da estimulação desses receptores em infecções fúngicas, este trabalho avaliará o uso de ligantes de Dectina-1 e TLR-2 (Zymosan) e Pam3csk4 (TLR-2), na modulação da atividade de células dendríticas infectadas com *P. brasiliensis* e sua possível utilização como terapia ou auxiliar de terapia na infecção murina por *P. brasiliensis*.

2 – Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Avaliar a capacidade imunomodulatória e o potencial uso terapêutico dos agonistas de PRRs Zymosan e Pam3csk4 sobre células dendríticas e camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos agonistas de PRRs na produção de citocinas por células dendríticas infectadas por *P. brasiliensis* ;
- Avaliar o impacto dos agonistas de PRRs no processo de maturação das células dendríticas infectadas por *P. brasiliensis*;
- Avaliar a influência dos agonistas de PRRs no desenvolvimento dos diferentes perfis de populações de linfócitos T no contexto de da infecção por *P. brasiliensis*.
- Avaliar a carga fúngica de pulmão e baço de camundongos infectados por *P. brasiliensis* e tratados com BMDCs estimuladas *in vitro* por Zymosan.

3 - Materiais e Métodos

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos selvagens (WT) da linhagem isogênica C57bl/6, que são susceptíveis à infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* (CALICH et al., 1985), machos, entre 8 e 12 semanas de idade. Também foram usados camundongos deficientes (KO) para os receptores TLR-2, TLR-4, Dectina-1, Dectina-2 e Dectina-3. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, em condições sanitárias com água e ração *ad libitum*. Os experimentos seguem as normas do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília com projeto aprovado número 117971/2014. (Anexo 1).

3.2 - *Paracoccidioides brasiliensis*

A infecção das células foi realizada com o isolado virulento 18 do fungo *P. brasiliensis* (KASHINO et al, 1985). O mesmo é mantido em meio de cultura semissólido Fava-Neto (protease peptona 0,3%, peptona 1%, extrato de carne 0,5%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5%, D-glicose 4%, ágar 1,8%, pH 7,2) em estufa a 37°C, sendo repicado semanalmente.

3.3 - Reagentes

Os seguintes agonistas de PRRs foram utilizados: Pam3CSK4 (agonista de TLR-2/1) e Zymosan (agonista de Dectina-1 e TLR-2) que foram adquiridos da Invivogen. As concentrações de uso para os testes *in vitro* foram as seguintes: Pam3CSK4 (300 ng/ml), Zymosan (20 µg/ml) Além desses agonistas, foi utilizado lipopolissacarideo (LPS) derivado de *Escherichia coli* sorotipo O111:B4 (500 ng/ml) e anticorpo bloqueador anti-mincle (10µg/ml).

3.4 - Obtenção de Células Dendríticas

As células dendríticas utilizadas foram obtidas por meio de diferenciação de células provenientes de medula óssea (BMDC) conforme (LUTZ et al., 1999). Para tal, células de medula óssea foram coletadas do fêmur e tíbia dos camundongos, a partir da lavagem com meio RPMI. 2×10^6 células de medula óssea foram cultivadas em volume de 10 mL de meio RPMI suplementado com HEPES (agente tamponante utilizado para a manutenção de pH fisiológico), β -mercaptoetanol (auxilia na proliferação celular), gentamicina (antimicrobiano para prevenir a contaminação da cultura), bicarbonato de sódio (auxilia no controle de pressão osmótica e na realização de potencial de ação celular), GM-CSF (20 ng/mL) (fator de diferenciação e sobrevivência de monócitos e granulócitos) e 10% de soro fetal bovino (SFB) em placa de petri.

Estas placas de petri foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. No terceiro dia de cultivo foram acrescentados mais 10 mL de meio RPMI suplementado. No sexto dia de cultivo metade do volume (10 mL) foi retirado e centrifugado, sendo o precipitado celular obtido ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI suplementado conforme descrito acima e recolocado novamente no meio de cultura original. No oitavo dia de cultivo células que não se apresentarem aderidas, células dendríticas, foram removidas do meio de cultura e utilizadas.

Imunofenotipagem por meio de citometria de fluxo indicou que 79% das células não aderentes eram positivas para CD11c e MHC II, caracterizando DCs, (dados não mostrados). As células KO para os diferentes receptores foram adquiridas a partir de da medula óssea de animais que não apresentam os determinados receptores.

3.5 – Infecção das células dendríticas com *P. brasiliensis*

Após a diferenciação, as DCs imaturas foram coletadas e infectadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* resuspensas em meio RPMI com a razão fagócito:levedura de 2:1 em placas de cultura de células de 24 e 48 poços. As culturas foram então incubadas a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas (ou conforme indicado) na presença ou não dos agonistas de PRRs, LPS e anticorpo anti-Mincle (o último introduzido na cultura 1 hora antes da infecção). Foi utilizado *transwell* na cultura para separar fisicamente o fungo da célula em cultura.

Transwell é um filtro, alocado na placa de 24 poços, após a BMDC ser colocada na placa e antes da infecção com o fungo. O dispositivo tem porosidade de 0.4 µm e permite que fungo e célula fiquem permeados pelo mesmo sobrenadante, mas sem ligação direta entre si.

3.6 - Dosagem de citocinas da cultura de células dendríticas infectadas

O sobrenadante retirado da cultura após 24 horas foi centrifugado e estocado a -20°C. Posteriormente foi utilizado para dosagem de citocinas utilizando o ensaio imunoenzimático “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) do tipo sanduíche, sendo o segundo anticorpo associado à enzima estreptavidina (HRP), que se liga em seu substrato, biotina, gerando cor. As citocinas analisadas foram IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40, IL-13, IL-17, IFN-γ e IL-18 e IL-27 seguindo as recomendações do fabricante dos kits Ready-SET-Go!® (eBioscience). As soluções de lavagem entre as etapas recomendadas (PBS 1X + Tween 20 0,05%) e de parada de reação (H₂SO₄ 2N) foram preparadas manualmente no laboratório. Ao fim do ELISA, as placas foram levadas ao espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices) para leitura em 450 nm.

3.7 - Co-cultivo de células dendríticas com esplenócitos

Esplenócitos totais foram obtidos a partir do divulsionamento do baço de dois camundongos saudáveis e então adicionados às placas de culturas por 3 horas em meio RPMI para o enriquecimento de linfócitos T, que não aderem na placa como os macrófagos e linfócitos B. Após essa etapa, as BMDCs foram adicionadas à cultura, seguidas do *P. brasiliensis* e/ou agonistas de PRRs (conforme descrito anteriormente). A proporção final foi 1:10 (DC:esplenócitos) e as co-culturas foram incubadas em meio RPMI suplementado para indução de proliferação celular por 5 dias em estufa a 37°C, quando os sobrenadantes foram coletados para avaliação de citocinas representativas das subpopulações de linfócitos T auxiliar: Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-13) e Th17 (IL-17A).

3.8 - Determinação dos níveis de transcritos de IL-12p35

RNA total de DCs foi extraído empregando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Tratamento com DNase durante a extração foi realizado a fim de assegurar que o produto final fosse livre de contaminação pelo DNA genômico. Após avaliação quantitativa e qualitativa do RNA, o mesmo foi transcrito de forma reversa para cDNA usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription®* (Applied Biosystems). Foi utilizado como molde 1 µg de RNA em reações de 20 µl contendo 2 µl de tampão da transcriptase reversa (10X), dNTPs 4 mM, iniciadores de sequências aleatórias e 50 U da enzima transcriptase reversa MultiScribe™. A reação de síntese do cDNA ocorreu sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos para desnaturação da enzima.

A quantificação do acúmulo diferencial de transcritos foi realizada por PCR quantitativo em tempo real. Foi utilizado o método de detecção por SYBR® Green, um intercalante fluorescente de dupla fita de DNA. Os ensaios foram realizados em reações de 10 µl contendo 5 µl de solução completa para qPCR com SYBR® Green 2X (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada iniciador (tabela 1) e 2 µl da reação de síntese de cDNA. Como parâmetros dos ciclos de amplificação foram realizados uma etapa inicial a 95°C por 20 segundos para ativação da DNA polimerase e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. Após os ciclos de amplificação foi realizada a análise da curva de dissociação (*melting curve*) dos produtos para verificação da especificidade da amplificação. A quantificação relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001). Esse método se baseia na comparação dos valores de Ct (ciclo de amplificação em que o sinal emitido atinge o limiar de detecção. *Threshold cycle*) entre as amostras dos grupos controle e experimental após normalização inicial pelo Ct de um gene constitutivo, onde $[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{grupo experimental})} - \Delta Ct_{(\text{grupo controle})}]$ e $[\Delta Ct = Ct_{(\text{gene estudado})} - Ct_{(\text{gene constitutivo})}]$. Como controle constitutivo foi escolhido o gene Rps9, que codifica uma das proteínas componentes da subunidade ribossomal 40S.

Tabela 1. Iniciadores para genes murinos utilizados nos ensaios de RT-qPCR. S: senso; As: antisenso.

Gene	Iniciadores	Sequência (5' → 3')
Rps9	S	CTATTCACCATGCCCCGTGTG
	As	GAGAGTCCAGGCGAACAATG
Il-12a	S	GGCCATCAACGCAGCACTTC
	As	CACAGGAGGTTTCTGGCGCA

3.9 - Citometria de Fluxo

As células dendríticas infectadas e/ou tratadas com agonistas de PRR (conforme descrito anteriormente) por 24 horas foram avaliadas quanto a expressão de marcadores de maturação por citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (APC e FITC) específicos para as moléculas de superfície de interesse por 30 minutos: anti-CD11c, anti-CD80 e anti-CD86 (todos da Ebioscience) com as concentrações sugeridas pelo fabricante. O anticorpo anti-CD11c foi associado ao fluoroforo APC, enquanto os demais foram associados ao fluoroforo FITC. Como controle isotípico foram utilizados anticorpos do mesmo isótipo contra antígenos não relacionados conjugados aos respectivos fluorocromos. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) e ressuspensas em 300µl do mesmo tampão. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSVerse – BD Biosciences), utilizando-se o software FlowJo X (TreeStar software). Foram adquiridos no mínimo 50.000 eventos em cada uma das amostras.

3.10 - Estímulo de DCs para tratamento *in vivo*

Após o protocolo de 8 dias de diferenciação de BMDCs, as mesmas foram coletadas e cultivadas em placa de petri, em uma quantidade de 8.10^6 em 10 ml de meio RPMI por placa. Com as células em cultura na placa, foi adicionado Zymosan, em uma concentração final de 20 $\mu\text{g/ml}$ e as placas foram mantidas em estufa a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO_2 por 6h.

3.11 – Infecção/tratamento intranasal de camundongos com BMDCs estimuladas por Zymosan

No dia zero, camundongos da linhagem C57BL6, machos, em média 8 semanas de idade foram infectados com *P. brasiliensis*. Os camundongos foram anestesiados, via intramuscular com 10 μl de uma solução de quetamina + xilazina, em uma proporção de 1:1. Então, cada camundongo recebeu, via intranasal, $1,5.10^6$ leveduras ressuspensas em 30 μl de meio RPMI, em duas etapas de 15 μl . Nos dias 2, 10 e 18, após anestesia, os camundongos (8 por grupo) foram submetidos ao tratamento com as BMDCs previamente estimuladas por 6 horas com Zymosan, BMDCs em repouso por 6 horas ou PBS. Os camundongos receberam pela via intranasal BMDCs ($1,5.10^6$) suspensas em 30 μl de meio RPMI, novamente com duas etapas de 15 μl . A infecção e o tratamento intranasal foram realizados com auxílio de micropipeta. Ao fim de 60 dias de experimento, os camundongos foram sacrificados e tiveram pulmão e baço coletados para análise de citocinas e de carga fúngica por meio de contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

3.12 - Análise estatística

Foi utilizada análise da variância (ANOVA) para determinar as diferenças entre os grupos experimentais, seguida pelo método pós-teste (Bonferroni t test). Testes e análises foram feitos pelo programa GraphPad Prisma versão 6.0 para Windows (San Diego, Califórnia, USA). Dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 - Resultados

4.1 – Agonistas de PRRs incrementam a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* por BMDCs infectadas por *P. brasiliensis* com exceção de IL-12p70

Inicialmente avaliamos a interação entre BMDCs tratados ou não com os agonistas de PRRs (zymosan e PAM3CSK4) e *P. brasiliensis*. Após 24 horas de cocultivo a dosagem das citocinas foi realizada por meio de ELISA (Figura 5). TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12 são citocinas pró-inflamatórias que estão associadas ao desenvolvimento de uma resposta adaptativa com predominância de linfócitos auxiliares Th1 e Th17, sendo assim, com perfil de resposta protetor à infecção de *Paracoccidioides brasiliensis* (CALICH *et al*, 2008; LANDMANN, WÜTRICH & HOHL, 2012). TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram secretadas por BMDCs infectadas com *P. brasiliensis* em quantidade significativamente maior do que em células não infectadas. A presença de Zymosan e PAM3CSK4 na cultura das células infectadas promoveu um aumento significativo na produção das mesmas citocinas, em comparação com os grupos infectados não tratados com agonistas de PRRs (Figura 5 A,B e C).

A citocina IL-12 é constituída por duas subunidades: p35 (35 kDa) e p40 (40 kDa), expressas em cromossomos diferentes. Juntas, essas subunidades formam a IL-12 bioativa, com 70 kDa (IL-12p70). Enquanto a subunidade p40 é comum a IL-12 e IL-23 (ambas pertencentes à família IL-12), p35 é exclusiva de IL-12 e secretada apenas na presença de p40 (GLUBER *et al*, 1991; WOLF *et al*, 1991; HAMZA, BARNETT & LI, 2010). Interessantemente, IL-12p70 não foi produzida significativamente em nenhum grupo de células infectadas, nem mesmo na presença de Pam3csk4 e Zymosan, que são agonistas que aumentam a produção dessa citocina na ausência do fungo (Figura 5D). Contudo, ao realizar a dosagem de IL-12p40, viu-se que o perfil de indução de produção não é o mesmo: IL-12p40 é produzida em quantidade significativa frente à infecção fúngica e essa produção é aumentada na presença dos dois agonistas de PRRs utilizados (Figura 5E). Tal fato indica possível inibição exercida pelo fungo *P. brasiliensis* sobre IL-12, indicando um

processo relacionado à produção da subunidade p35 da citocina, já que, como observado, a subunidade p40 não apresenta padrão inibido de produção.

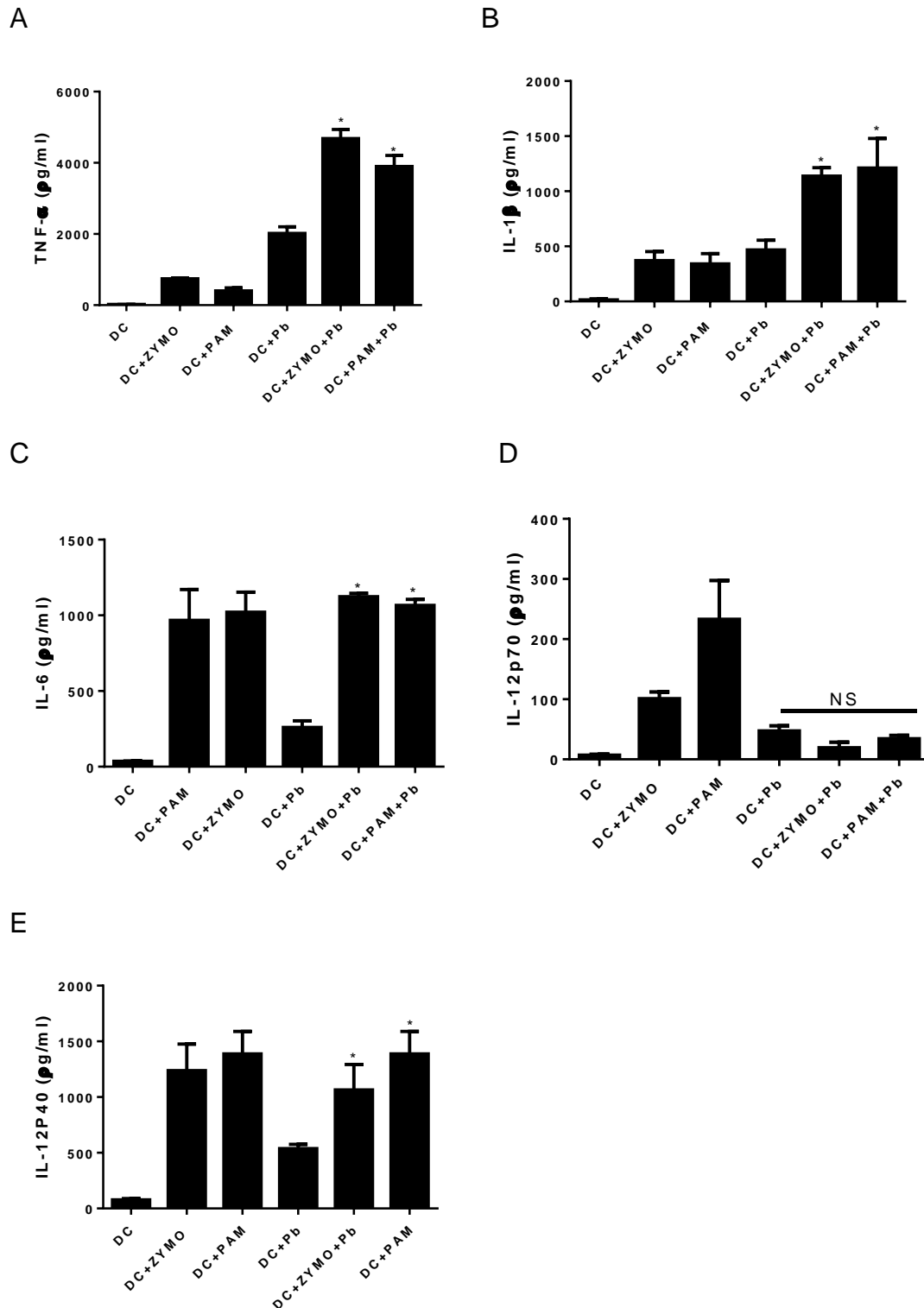


Figura 5. Dosagem das citocinas TNF-α (A), IL-1β (B), IL-6 (C), IL-12p70 (D) e IL-12p40 (E) do sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectados ou não com *P. brasiliensis* (Pb) (MOI 2:1) e/ou tratados com os agonistas de PRRs Zymosan (Zymo; 20 ug/ml) ou PAM3CSK4 (PAM; 300ng/ml) por

24h, por meio de ELISA. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo DC+Pb. NS: não significativo em relação ao grupo DC+Pb. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

4.2– O processo inibitório exercido sobre IL-12p70 se dá na transcrição de sua subunidade p35

IL-12 é de grande importância para o hospedeiro de *P. brasiliensis*, uma vez que ela é capaz de auxiliar na diminuição da disseminação da PCM humana e murina e contribuir para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa com linfócitos auxiliares (CD4+) do tipo Th1 (ARRUDA *et al*, 2002; CALICH *et al*, 2008; DE CASTRO *et al*, 2013). IL-12 também se faz importante por induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T e células NK, sendo assim um fator essencial para a resistência contra infecções não apenas de caráter fúngico, mas também causadas por bactérias e protozoários intracelulares (TRINCHIERI, 2003; CASADEVALL, 2008).

Sendo assim, a avaliação do potencial inibitório exercido pelo *P. brasiliensis* na produção de IL-12 foi expandida utilizando-se BMDCs estimuladas com LPS para analisar o perfil de produção de IL-12p70 (Figura 6A). Como esperado, LPS induziu a produção de altos níveis de IL12p70, porém na presença do fungo ocorre uma extensiva inibição nessa produção, confirmando o efeito inibitório exercido pelo *P. brasiliensis* em BMDCs. Diante desse resultado e considerando o fato de não ocorrer disponibilidade comercial de ELISA específico para a subunidade p35 da IL-12, avaliou-se os níveis de transcritos de *il-12a* (gene que codifica a subunidade p35 da IL-12) por PCR quantitativo em tempo real em BMDCs estimuladas com LPS e infectadas ou não com *P. brasiliensis*. Viu-se que os níveis dos transcritos de *il-12a* foram drasticamente reduzidos na presença do fungo, indicando que a inibição causada por *P. brasiliensis* ocorre na subunidade p35, exclusiva da IL-12 (Figura 6B).

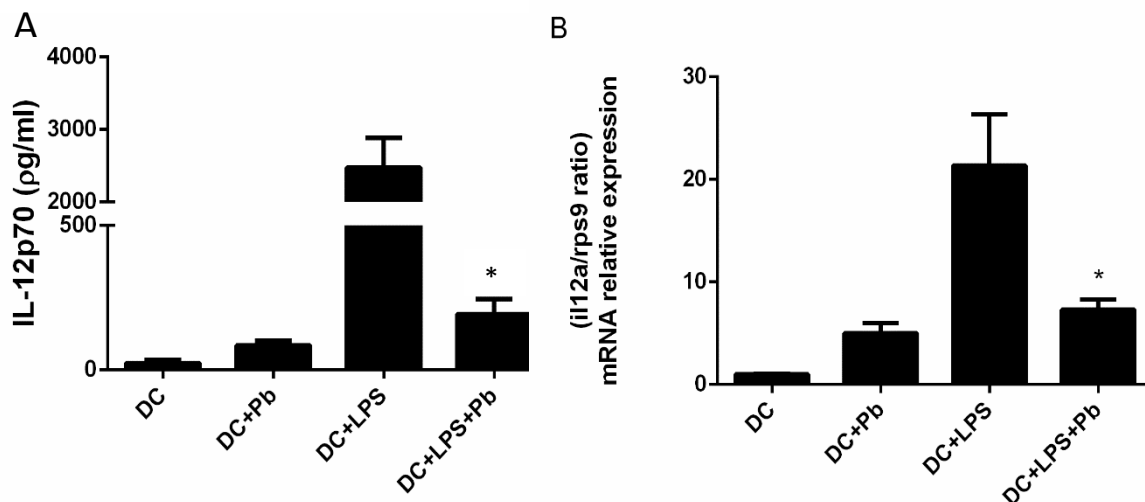


Figura 6. Produção de IL-12p70 na presença de LPS. (A) A produção de IL-12p70 foi avaliada no sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectadas com *P. brasiliensis* (PB) e/ou tratadas com LPS (*E. coli* sorotipo O111:B4 100 ng/ml) por 24h, utilizando ELISA. (B) Níveis de transcritos de *il12a* (p35) nas mesmas condições que (A), utilizando PCR quantitativo em tempo real. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo DC+LPS. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

A redução da produção de IL-12p70 já foi mostrada anteriormente, mas não foi realizada análise da via e de prováveis mecanismos usados pelo *P. brasiliensis* para inibir a citocina (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004).

4.3 - A inibição de IL-12p70 em BMDCs infectados por *P. brasiliensis* é condicionada ao reconhecimento direto com o fungo

Já foi identificado que algumas espécies fúngicas do gênero *Fonsecaea*, incluindo o *F. pedrosoi*, um dos principais agentes etiológicos da cromoblastomicose, têm, como um mecanismo de evasão do sistema imunológico, a capacidade de inibir a produção de IL-12p70 por BMDCs. Esse processo também se dá via inibição da transcrição do gene que codifica a subunidade p35 de IL-12 e ocorre mediante o reconhecimento do fungo pelo receptor PRR Mincle. (WEVERS *et al.*, 2014).

Conhecendo esse mecanismo de inibição de outra espécie fúngica patogênica, decidiu-se investigar se a inibição exercida por *P. brasiliensis* ocorre de forma semelhante. Assim, inicialmente foi realizada cultura celular com a presença de *transwell*. O princípio do uso desse dispositivo é separar fisicamente o fungo da célula e impedir o contato direto entre os dois, mas permitir que eles fiquem imersos no mesmo sobrenadante. Dessa forma, é possível avaliar se o contato direto via

PRRs é essencial para a ação ou se o processo inibitório pode ocorrer por algum componente secretado do fungo, por exemplo.

Como pode ser observado na figura 7, na ausência do transwell, quando ocorre o contato direto entre fungo e BMDC, a produção de IL-12p70 por BMDCs infectados por *P. brasiliensis* e tratados com LPS não é significativa, como esperado. Contudo, essa produção de IL-12p70 é revertida com a separação física do fungo e as BMDC, pois na presença do dispositivo de separação a produção de IL-12p70 aumenta significativamente. Tal resultado indica que o reconhecimento direto do *P. brasiliensis* pelas células dendríticas é indispensável para o processo de inibição, o que pode ser um indicativo de que receptores PRRs estejam envolvidos no mecanismo. Assim, avaliamos o possível papel de PRRs na inibição de il-12 em BMDCs infectadas por esse fungo.

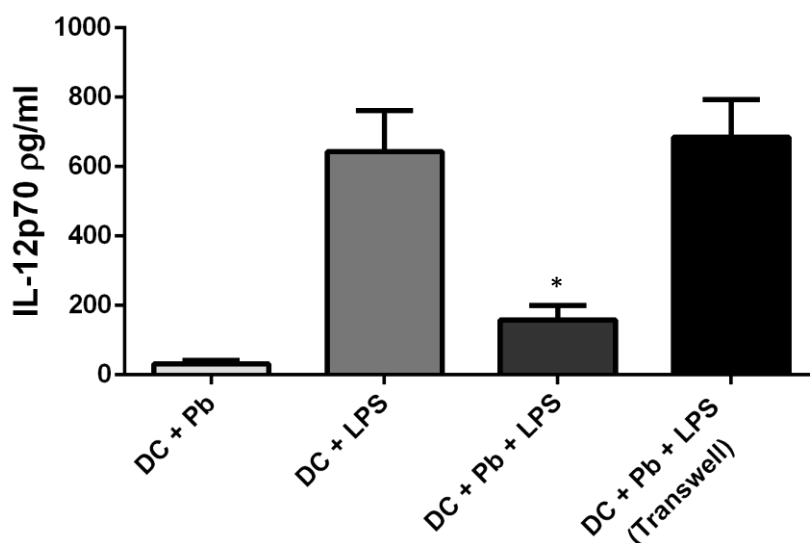


Figura 7. Detecção de IL-12p70 no sobrenadante de cultura de BMDC (DC) infectadas com *P. brasiliensis* (Pb), tendo contato direto ou sendo separadas do fungo por *transwell* e estimuladas ou não com LPS. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo DC+LPS. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

Considerando a possibilidade da ligação em Mincle exercer atividade inibitória também na infecção por *P. brasiliensis*, essa interação foi avaliada. Utilizou-se anticorpo anti-mincle para bloquear a ação desse receptor e verificar se assim a produção de IL-12p70 ocorreria na presença do fungo. Outros PRRs também foram

avaliados: Dectina-1, Dectina-2, Dectina-3, TLR-2 e TLR-4. Para fazer essa análise foram utilizadas BMDCs deficientes para Dectina-1, Dectina-2, Dectina-3, TLR-2 e TLR-4, que são envolvidos no reconhecimento de fungos patogênicos incluindo *P. brasiliensis* (LOURES *et al*, 2009; LOURES *et al*, 2014; FERRIOTTI *et al.*, 2015; PREITE *et al.*, 2018).

Mesmo com o bloqueio do receptor Mincle e a deficiência dos demais receptores, não ocorreu reversão da inibição exercida pelo fungo em BMDCs, uma vez que a produção de IL-12p70 ainda permanece inibida (Figura 8). Assim, nenhum dos receptores avaliados parece participar do mecanismo de inibição da produção de IL-12 pelo *P. brasiliensis* e o mecanismo pelo qual isso ocorre permanece desconhecido.

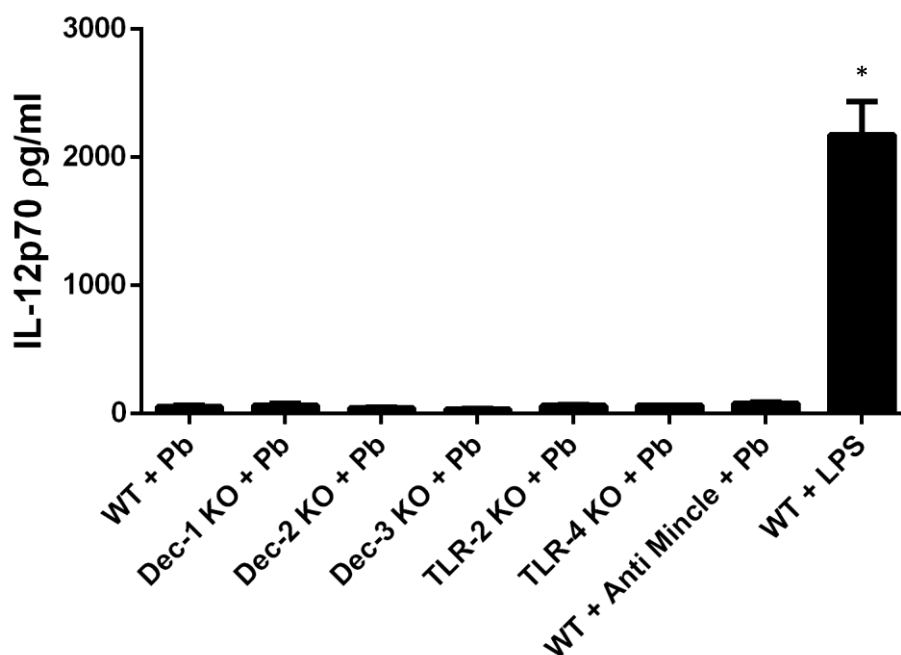


Figura 8. Dosagem de IL12p70 no sobrenadante de culturas de BMDCs WT (tipo selvagem), Dec-1 KO (deficiente para dectina-1), Dec-2 KO (deficiente para dectina-2), Dec-3 KO (deficiente para dectina-3), TLR-2KO (deficiente para TLR2), TLR4-KO (deficiente para TLR4) , WT + Anti-mincle (BMDCs tipo selvagem tratadas com anticorpos bloqueadores do receptor mincle; 10ug/ml) infectadas com *P. brasiliensis* (Pb) por 24h ou WT + LPS (BMDCs tratadas com LPS). * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo WT+Pb. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

4.4- Agonistas de PRRs estimulam a maturação de BMDCs infectadas por *P. brasiliensis*

Um dos processos imprescindíveis para que as DCs realizem a apresentação de antígenos de forma adequada aos linfócitos é a sua maturação. Quando seus PRRs são ativados e dão início às suas respectivas vias de sinalização, proteínas de superfície passam a ser mais expressos, como é o caso das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, que associadas à apresentação de antígenos via moléculas de MHC, são essenciais para a ativação de linfócitos T virgens (BANCHEREAU *et al*, 2000; WÜTHRICH, DEEP & KLEIN, 2012).

Nesse contexto, foi realizada uma análise em citômetro de fluxo para elucidar a capacidade dos agonistas de PRRs de modularem o processo de maturação das BMDCs (Figura 9). É possível observar que a expressão de ambas as moléculas, CD80 e CD86, é aumentada quando Zymosan e PAM3CSK4 são adicionados às BMDCs infectadas com *P. brasiliensis*. Este fato ocorre tanto em relação à porcentagem de células da cultura que expressam essas moléculas coestimulatórias (Figura 9C), como em relação à quantidade que essas BMDCs passam a expressar tais moléculas (Figura 9D).

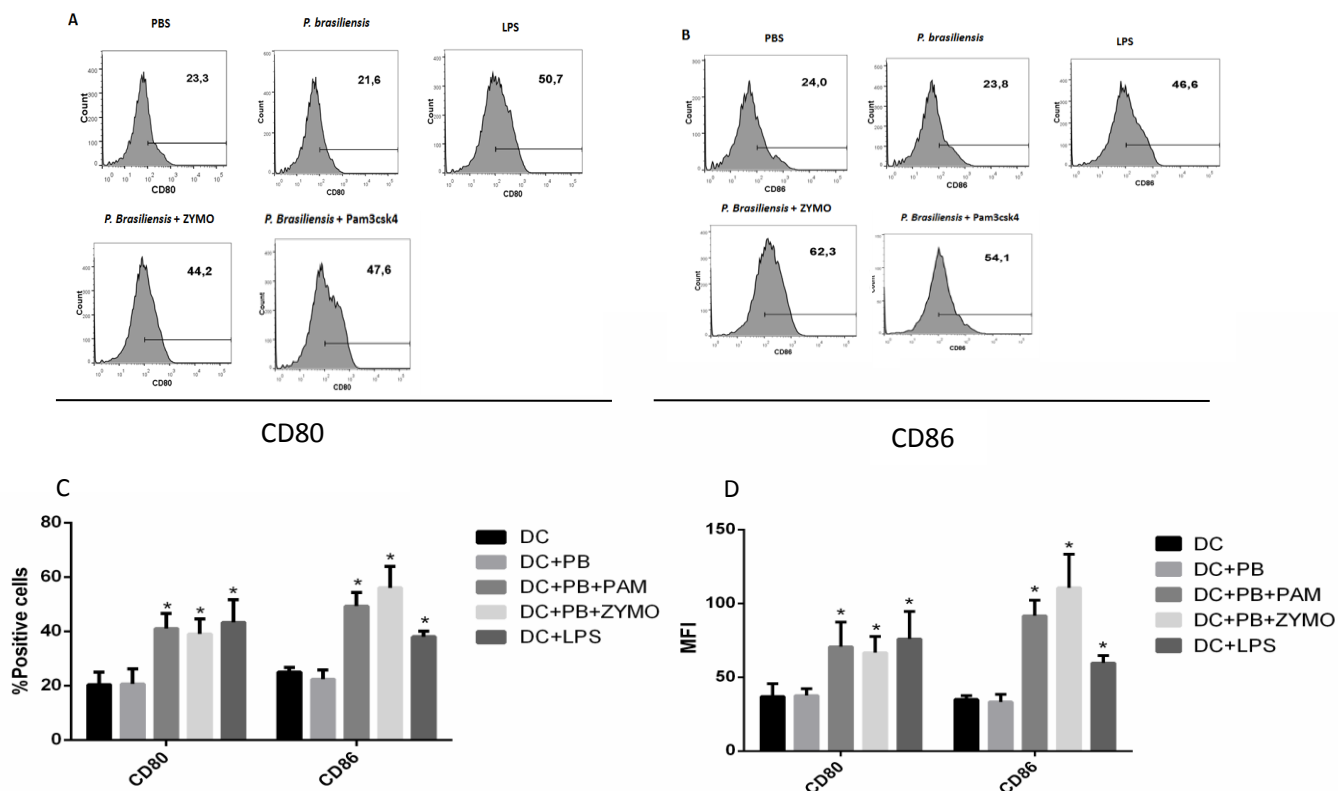


Figura 9: Histogramas representativos da análise de expressão dos marcadores de maturação CD80 (A) e CD86 (B) de BMDC (DC) infectadas por *P. brasiliensis* (Pb) e tratadas ou não com agonistas de PRRs Zymosan (Zymo; 20 ug/ml) ou PAM3CSK4 (PAM; 300ng/ml) por 24h, por meio de citometria de fluxo. (C) Porcentagem de células expressando (positivas) os marcadores. (D) A intensidade média de fluorescência (MFI *mean fluorescent index*) da expressão desses marcadores.* indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo DC+Pb. Os dados (C e D) são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes conduzidos em triplicata.

4.5 – Os agonistas de PRRs modulam o perfil da população de linfócitos T auxiliares induzidos por BMDC infectadas por *P. brasiliensis*

Na paracoccidiodomicose, o desenvolvimento de um perfil Th1 é essencial, pois é considerado como protetor e está relacionado com a resistência a essa infecção tanto em humanos, como no modelo murino. (DE CASTRO *et al*, 2013). Assim, neste trabalho foi avaliado de que forma os agonistas de PRRs estudados alterariam o perfil das subpopulações de linfócitos T auxiliares. BMDCs infectadas com *P. brasiliensis* e tratadas ou não com os agonistas de PRRs foram cocultivadas com esplenócitos totais enriquecidos para linfócitos T e o sobrenadante dessa cultura avaliado quanto a produção de citocinas características das populações de linfócitos Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-13) e Th17 (IL-17).

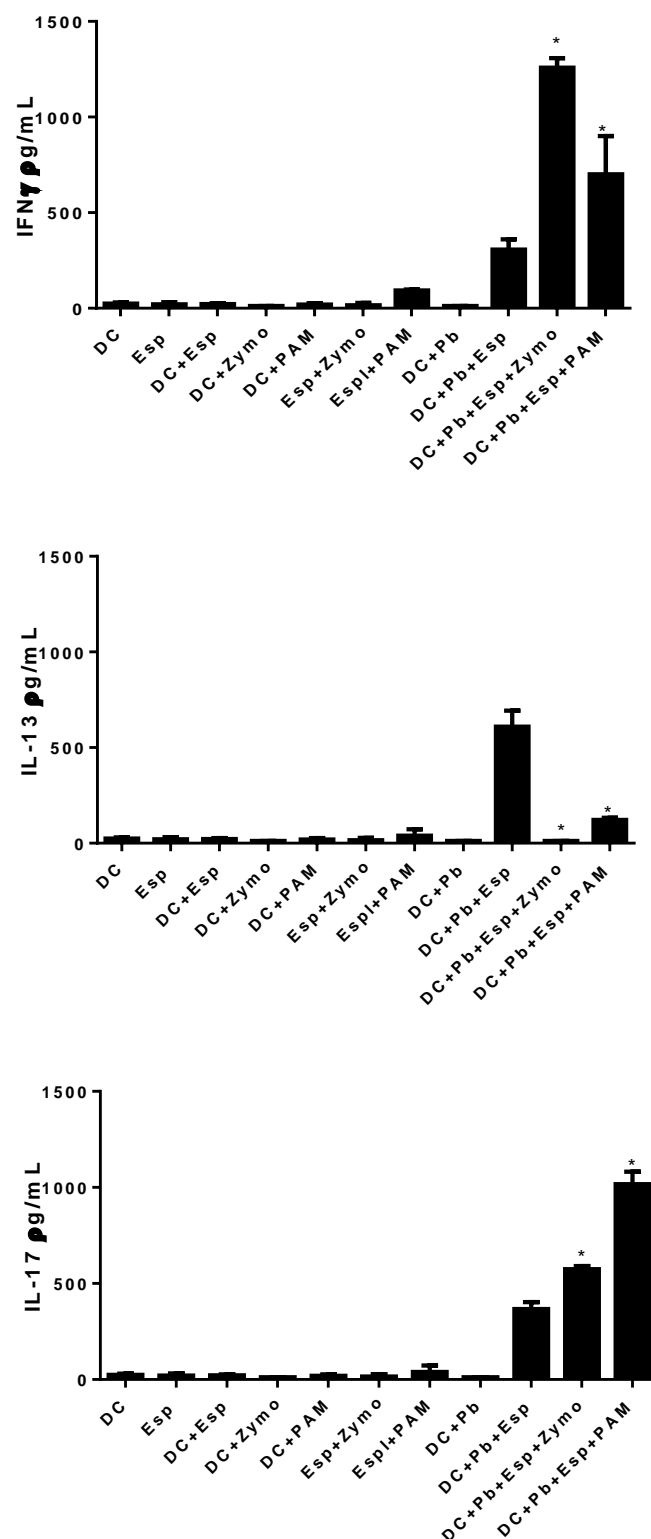


Figura 10. Quantificação de IFN- γ , IL-13 e IL-17 no sobrenadante de co-culturas de BMDC (DC) infectadas por *P. brasiliensis* (Pb) e esplenócitos (Esp) enriquecidos de linfócitos T tratados com agonistas de PRRs Zymosan (Zymo; 20 ug/ml) ou PAM3CSK4 (PAM; 300ng/ml). * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo DC+Pb+Esp. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

O tratamento com os agonistas proporcionou uma mudança do perfil de linfócitos T, pois induziu um aumento significativo da produção de IFN- γ e IL-17 pelos esplenócitos e ao mesmo tempo reduziu significativamente a secreção da citocina característica de populações Th2, IL-13 (Figura 10). Dessa maneira, o tratamento de BMDCs com agonistas de PRRs Zymosan e Pam3csk4 induz uma resposta com potencial protetor (Th1 e Th17), sugerindo que esse tratamento poderia beneficiar o hospedeiro em infecções *in vivo*.

4.6 – IL-18 e IL-27 são capazes de induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T auxiliares, mesmo com a inibição induzida de IL-12p70 em BMDC infectadas por *P. brasiliensis*

Considerando que o fungo inibe a produção de IL-12p70 em BMDCs, via inibição da expressão de *il12a* (IL-12p35), e que essa citocina é a principal que induz a diferenciação de linfócitos Th1, foram dosadas no sobrenadante das coculturas com esplenócitos outras citocinas associadas à indução da diferenciação para essa subpopulação como, IL-18 e IL-27, a fim de elucidar de que forma os agonistas induzem uma maior produção de IFN- γ , a citocina característica da subpopulação Th1.

Observou-se que os agonistas Zymosan e PAM3CSK4 têm a capacidade de induzir significativamente o aumento da produção das citocinas IL-18 e IL-27 em BMDCs infectadas por *P.brasiliensis* (Figura 11). Assim, o aumento de produção de IFN- γ por linfócitos T provavelmente se dá via aumento de produção de IL-18 e IL-27.

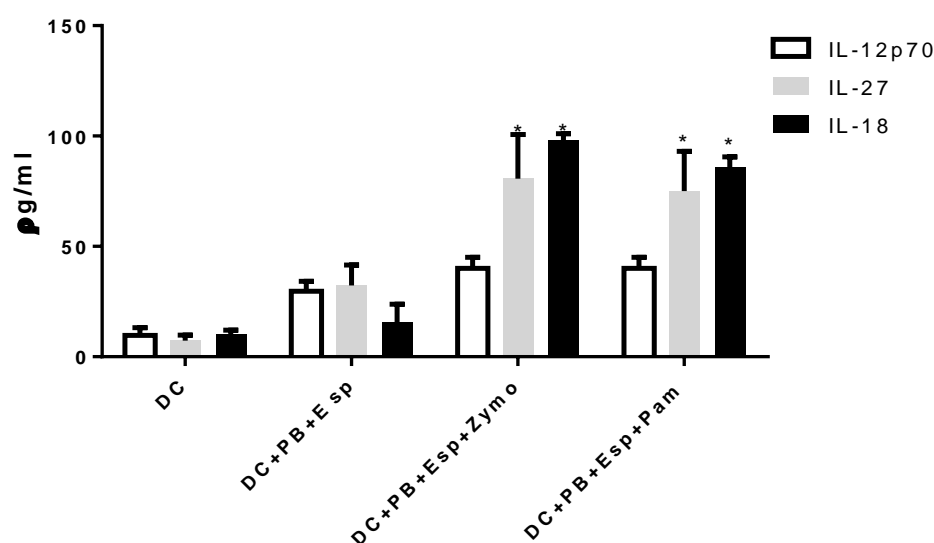


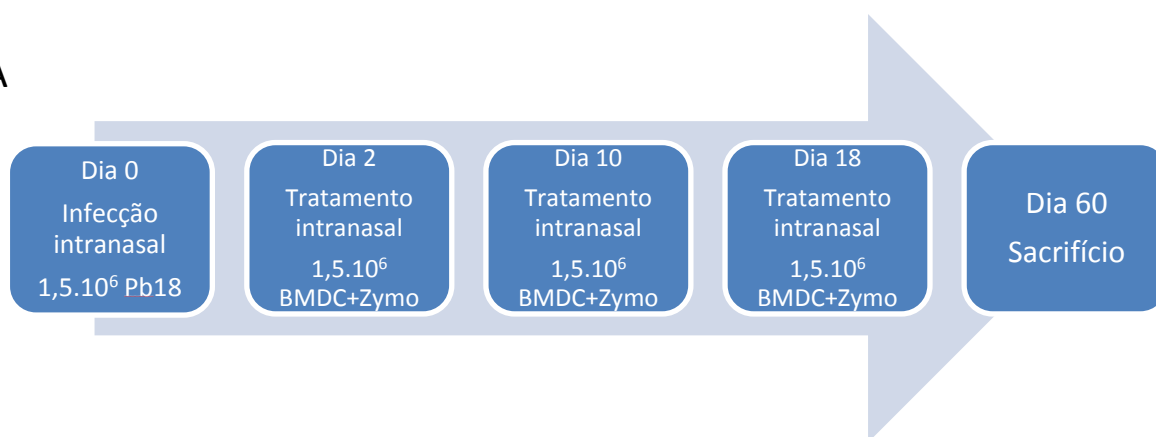
Figura 11. Quantificação de IL-12, IL-18 e IL-27 no sobrenadante de co-culturas de BMDC (DC) infectadas por *P. brasiliensis* (Pb) e esplenócitos (Esp) enriquecidos de linfócitos T tratados com agonistas de PRRs Zymosan (Zymo; 20 ug/ml) ou PAM3CSK4 (PAM; 300ng/ml). * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo DC+Pb+Esp. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

4.7 – O tratamento com BMDCs estimuladas por Zymosan reduz a carga fúngica em pulmão e baço de camundongos infectados por *P. brasiliensis*

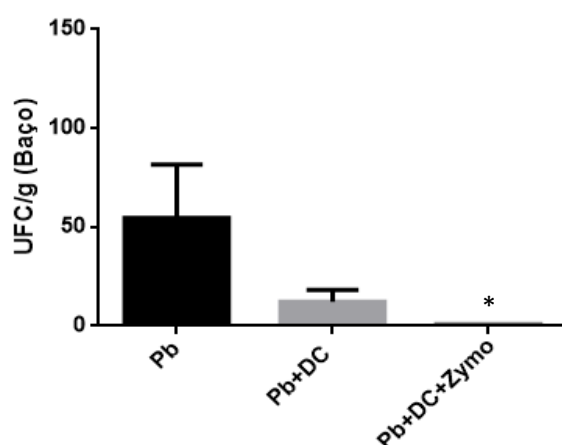
O aumento da produção de IFN- γ visto nesse trabalho representa o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa considerada protetora com perfil de linfócitos Th1, pois são eles que produzem essa citocina. Levando em conta as funções de IFN- γ na PCM, mais uma vez o tratamento com os agonistas de PRRs se mostra importante, sugerindo que pode ser útil para o hospedeiro desenvolver uma melhor resistência à essa micose sistêmica.

Dessa forma, foi realizado experimento avaliando o tratamento *in vivo* em camundongos C57BL6 com Zymosan após a infecção. O dia da infecção, que se deu por via intranasal, com *P. brasiliensis*, é considerado o dia zero e o tratamento com BMDCs estimuladas por Zymosan ou BMDCs sozinhas, também via intranasal, foi realizado nos dias 2, 10 e 18 (Figura 11A). Os camundongos foram sacrificados após 60 dias e então a análise foi realizada.

A



B



C

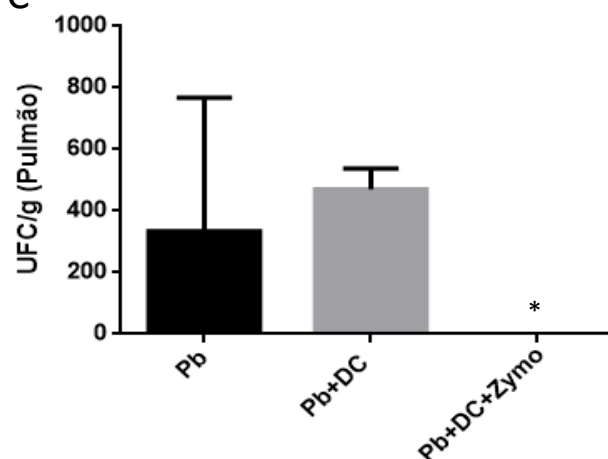


Figura 12. Fluxograma do experimento *in vivo* realizado em camundongos C57BL6, constituído por infecção intranasal com $1,5 \cdot 10^6$ células fúngicas, seguida por três doses de tratamento com $1,5 \cdot 10^6$ BMDCs tratadas por 6 horas ou não com zymosan (DC ou DC+Zymo), seguido pelo sacrifício do camundongo para posterior análise. (A) Quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de baço (B) e pulmão (C) de camundongos infectados tratados com PBS (Pb), infectados e tratados somente com BMDCs em repouso por 6 horas (Pb+DC) ou infectados e tratados com BMDCs estimuladas por zymosan *ex vivo* por 6 horas. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo Pb. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

O tratamento com os agonistas de PRRs se mostrou importante para reduzir a carga fúngica do baço e do pulmão (Figura 11B e C). No baço, a carga fúngica já é reduzida com o tratamento de BMDCs sem estímulo de agonista, e a presença de fungo não pode ser detectada no grupo que recebeu BMDCs estimuladas com

Zymosan. Já no pulmão, o grupo de camundongos não tratados e tratados apenas com BMDCs não mostrou diferença, já o terceiro grupo, que recebeu BMDCs estimulada com Zymosan, não apresentou presença de carga fúngica. Tal resultado indica que o tratamento avaliado no presente estudo, auxilia na eliminação do fungo pelo hospedeiro, uma vez que após o tratamento, baço e pulmão apresentam menos unidades formadoras de colônias. A análise histopatológica do pulmão está em processamento, para visualizar a carga fúngica do tecido e para avaliar a formação de granulomas. Análise das citocinas produzidas nos tecidos é a próxima etapa do trabalho.

5 – Discussão

A PCM é uma doença com a característica de cronicidade, requerendo um longo período de tratamento. Com isso, os casos de efeitos adversos e toxicidade, principalmente hepática, dos fármacos antifúngicos acabam reduzindo a adesão ao tratamento, que mesmo quando feito corretamente pode ter baixa eficácia. Tendo isso em vista, além do fato do aumento da resistência aos medicamentos por alguns isolados do *P. brasiliensis*, é necessária a busca por alternativas terapêuticas.

Nesse contexto, o uso de agonistas para o estímulo de PRRs e modulação da resposta imune tem sido cada vez mais estudado. Em pacientes portadores de PCM foi realizado um estudo na década de 90, que comparou o tratamento com antifúngicos ao tratamento com antifúngicos associado à administração intravenosa de β -glicana derivada da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, assim como o zymosan. Esse trabalho mostrou que o progresso clínico daqueles pacientes que receberam a glicana foi maior do que os que não receberam (com maior produção de TNF- α e aumento nos níveis de anticorpos) mesmo que o primeiro grupo tivesse inserido propositalmente os pacientes mais graves (MEIRA *et al*, 1996). β -1,3-glicana também foi utilizada associada a itraconazol, fármaco antifúngico, em caso de cromoblastomicose causada por *Fonsecaea pedrosoi*. Em 6 anos de tratamento utilizando apenas o fármaco, o paciente não apresentou melhora clínica, mas em 6 meses de tratamento associado à β -glicana suas lesões reduziram consideravelmente (AZEVEDO *et al*, 2008). Além da β -glicana, o uso de ligantes de TLRs exógenos incluindo PAM3CSK4 restaura o reconhecimento inato de *F. pedrosoi* levando a resolução da infecção em modelo murinho sem efeitos adversos (de SOUSA *et al.*, 2011).

Sabendo que a imunoestimulação com agonistas de PRRs pode ser clinicamente interessante e benéfica frente a essa infecção, além de ter a capacidade de alterar o tipo de resposta imune adaptativa desenvolvida, pesquisas nessa linha são de grande importância para caracterizar o potencial de diferentes agonistas e estudar seu uso terapêutico na busca de novos tratamentos para doenças fúngicas.

No presente estudo observamos que o estímulo de células dendríticas infectadas por *P. brasiliensis* com dois agonistas de PRRs, Zymosan (ligante de

dectina-1 e TLR2) e PAM3CSK4 (*ligante* de TLR2), é capaz de modular positivamente a produção de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-6), que possuem papel importante na imunidade inata na infecção por esse fungo (Figura 5). IL-1 β , via sinalização medida por seu receptor IL-1R, é uma citocina que influencia diretamente a atividade microbida frente à infecção com *P. brasiliensis*, controlando seu crescimento intracelular (TAVARES *et al*, 2013). A síntese de pró-IL-1 β é estimulada pela sinalização de PRRs, como CLRs e TLRs, e depende da ativação da via canônica de NF κ B. Além disso, a pró-IL1 β necessita ser clivada para dar origem à sua forma bioativa, IL-1 β . Isto ocorre devido à atividade do complexo inflamassoma NLRP3, dependente de caspase-1, uma enzima tirosina-quinase. A importância desse complexo e produção das citocinas dependentes da sua ativação (IL-1 β e IL-18) *in vivo* na resistência a infecção pelo *P. brasiliensis* foi observada em modelos tanto de infecção sistêmica como pulmonar de PCM (KETELUT-CARNEIRO *et al*, 2015; FERIOTTI *et al.*, 2015) e outros fungos (TAVARES *et al.*, 2015).

TNF- α e IL-6 também são citocinas pró-inflamatórias envolvidas com a proteção do hospedeiro na PCM. TNF- α é uma das primeiras citocinas a ser produzida, desencadeando a resposta imune e é encontrada em alta quantidade em camundongos resistentes à infecção com *P. brasiliensis* (CALICH *et al*, 1998; 2008). TNF- α também é um importante indutor do processo de migração de DCs para os linfonodos (SAID & WEINDL, 2015). TNF- α produzido por fagócitos em resposta aos componentes da parede celular do *P. brasiliensis* é necessário para o acúmulo e diferenciação de macrófagos em células epitelióides e para a persistência de granulomas bem estruturados nos pulmões, sendo necessários para contenção e resposta anti-fúngica adequada (FIGUEIREDO *et al*, 1993; KNDLER *et al*, 1989). De fato, Souto *et al.* (2000), utilizando camundongos deficientes geneticamente para o receptor p55 de TNF- α , observaram um infiltrado inflamatório no pulmão composto de poucos neutrófilos, macrófagos e células epitelióides formando granulomas incipientes com grande número de leveduras do fungo e disseminação.

A importância do TNF- α na formação do granuloma também foi demonstrada para humanos utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) com PCM. Demonstrou-se que a formação *in vitro* de granuloma, em resposta a diferentes frações antigênicas de *P.*

brasiliensis, estava associado a uma maior produção de TNF- α (DINIZ *et al.*, 2001). Além disso, pacientes com forma mais severa da PCM (juvenil ou aguda) apresentam níveis de TNF- α reduzidos (DE CASTRO *et al.*, 2013).

Por sua vez, IL-6 é muito importante para a manutenção da resposta adaptativa com predominância de linfócitos Th1. Camundongos que não expressam essa citocina têm maior produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória, relacionada com perfil de resposta Th2) e baixa atividade de linfócitos Th1. Ainda foi observado que pacientes com candidíase vaginal recorrente têm baixa produção de IFN- γ local, pois as células epiteliais da mucosa não produzem IL-6 (ROMANI, 2011).

Diferentemente de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a produção de IL-12p70 não foi induzida ou aumentada com a adição dos agonistas em níveis significativos em BMDC infectadas com *P. brasiliensis*, ainda que na ausência do fungo esses agonistas induzem secreção de IL-12. Tal fato sugere fortemente que o *P. brasiliensis* tem a capacidade de inibir a produção de IL-12, o que pode ser considerado um mecanismo de evasão do sistema imune. Essa inibição já foi sugerida por FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004, mas o mecanismo não foi elucidado. Para aprofundar nessa questão, foi realizada dosagem de IL-12p40, que é a subunidade comum às citocinas IL-12 e IL-23, e foi visto que ela não apresenta produção inibida quando na presença do fungo (Figura 5E).

Para confirmar o processo de inibição, foi realizado experimento utilizando LPS, que é um forte indutor da produção de IL-12. Como visto na figura 6A, na ausência de infecção as BMDCs produzem níveis elevados de IL-12, mas quando *P. brasiliensis* é adicionado à cultura, a produção cai drasticamente. Sendo assim, utilizou-se LPS para avaliar a produção da subunidade p35 de IL-12, avaliando os níveis de transcritos do gene IL12A (responsável por codificar essa subunidade) por meio de PCR quantitativo em tempo real (Figura 6B), que se mostraram menores na presença do fungo, evidenciando que a inibição exercida pelo *P. brasiliensis* ocorre na transcrição do gene *il12a*.

O principal papel de DCs é o processamento de microrganismos para apresentação de antígenos à linfócitos T auxiliares virgens, iniciando assim a reposta imune adaptativa. Nesse contexto a natureza da interação entre a própria DC e o microrganismo e as citocinas e moléculas coestimulatórias produzidas, direcionam o tipo predominante de linfócitos auxiliares. A produção de IL-12

caracteriza um perfil de resposta com predominância de linfócitos Th1, relacionados com pacientes assintomáticos ou com formas clínicas menos agressivas (crônica) de PCM, enquanto as citocinas IL-4, IL-13 e TGF- β caracterizam uma resposta adaptativa com predominância de linfócitos Th2, relacionada principalmente com a forma severa juvenil ou a crônica disseminada da doença (BANCHEREAU *et al*, 2000; TRINCHIERI, 2003; CALICH *et al*, 2008; DE CASTRO *et al*, 2013).

Tendo em vista o conhecimento de como o fungo *F. pedrosoi* inibe IL-12p70, mostramos que o contato entre *P. brasiliensis* e BMDC é necessário para que ocorra a inibição de IL-12p70 (Figura 7). Isso sugere que a estrutura responsável pelo processo não seja secretada pelo fungo, mas que possivelmente seja componente da parede celular fúngica interagindo com PRRs na membrana plasmática, semelhante ao que ocorre com o *F. pedrosoi*, que é capaz de se ligar no receptor Mincle de BMDCs, ativando vias de sinalização que causam a perda da atividade nuclear de IRF1 (*interferon regulatory factor 1*), e consequentemente levando ao bloqueio da transcrição do gene *il12a* (WEVERS *et al*, 2014). Apesar de o presente estudo mostrar que a interação direta é importante, não foi concluído como, de fato, a inibição ocorre, uma vez que o bloqueio ou ausência dos receptores estudados não restabeleceu a produção de IL-12 (Figura 8), como é o caso mostrado por Wevers *et al* na infecção por *F. pedrosoi*.

A cronicidade da PCM pode se dar devido à inúmeros processos de evasão do sistema imune que o fungo apresenta. O *P. brasiliensis* é capaz, por exemplo, de impedir o seu reconhecimento pelos PRRs, inibir a produção de citocinas importantes para o hospedeiro (como é o caso da IL-12) e impedir em DCs o aumento da expressão de MHC de classe II e das moléculas coestimulatórias CD54, CD80 e CD86, mesmo na presença de LPS, considerado um potente indutor da maturação dessas células, (FERREIRA, LOPES & ALMEIDA, 2004;), diminuindo a apresentação antigênica a linfócitos T virgens e culminando em uma menor capacidade de desenvolver uma resposta adaptativa protetora ao hospedeiro (DOS SANTOS, FERREIRA & ALMEIDA, 2011). Tal fato pode ser considerado um dos principais meios de evasão, pois se sabe que ele também é capaz de reduzir a expressão de MHC de classe II em macrófagos (BOCCA *et al*, 1999).

Sendo assim, novamente observa-se que o tratamento com os agonistas de PRRs é benéfico e pode promover o desenvolvimento de uma resposta imune

adequada, pois consegue reverter a redução da expressão de marcadores de maturação causada pelo *P. brasiliensis* em BMDCs (Figura 9), o que é fator determinante para induzir a ativação da resposta adaptativa seguida da diferenciação de linfócitos T (THIND, TABORDA & NOSANCHUK, 2015). Logo, o tratamento com os agonistas de PRRs não se limita ao fato de aumentar a expressão de moléculas coestimulatórias, mas significa um potencial para modular os tipos de linfócitos T desenvolvidos durante a infecção, como observado na Figura 10, já que após o tratamento o perfil de linfócitos predominantes é alterado de Th2 e passa a ser Th1 e Th17.

Na PCM murina, sabe-se que IFN- γ , produzido por linfócitos Th1, tem a habilidade de regular a produção de quimiocinas e seus receptores, além de modular os tipos celulares presentes no infiltrado celular nos pulmões. Camundongos deficientes para IFN- γ têm uma pequena quantidade de macrófagos nos pulmões, além de menor presença de linfócitos T, quando comparado ao grupo selvagem. Quimiocinas importantes para a formação de granulomas, como CCR2, CCR5 e CXCR3, também são menos expressas nos camundongos deficientes para IFN- γ (SOUTO *et al*, 2003).

A importância de IFN- γ também já foi demonstrada para a formação adequada de granulomas, que são estruturas geradas para conter o crescimento do fungo e evitar sua disseminação, compostas por células epiteliais, macrófagos e neutrófilos. Na ausência de IFN- γ , o granuloma formado tem poucas células, é frouxo e há grande número de leveduras (CANO *et al*, 1998; SOUTO *et al*, 2000; KETELUT-CARNEIRO *et al.*, 2015). Essa citocina ainda é importante para o aumento da produção de NO, para a ativação de macrófagos, que são as principais células efectoras da imunidade celular, levando-os a ter uma melhor atividade microbicida e para induzir a produção de imunoglobulinas IgG2a e IgG3, que atuam na fixação do sistema complemento e na opsonização do fungo (CANO *et al*, 1995; SOUTO *et al*, 2000; KETELUT-CARNEIRO *et al.*, 2015).

Em estudo realizado com células de humanos infectados com *P. brasiliensis*, também já foi mostrado que pacientes assintomáticos apresentam os níveis mais altos de IFN- γ (tanto os níveis do transcrito do gene da citocina, quanto sua dosagem na cultura por ELISA são maiores) do que aqueles com as formas crônica e aguda da doença, que têm altos níveis de IL-4, relacionada com linfócitos Th2

(principalmente aqueles com a forma aguda da PCM) (DE CASTRO *et al*, 2013). Tal fato, mais uma vez relacionada a importância de IFN- γ com a resistência à infecção.

A IL-17 é crucial em infecções fúngicas principalmente nos sítios de mucosas, por facilitar o recrutamento de neutrófilos para esses locais, reduzindo a disseminação de infecções por espécies de *Candida* e *Aspergillus* (CONTI *et al.*, 2014; CALICH, MAMONI & LOURES, 2018). Na PCM, a presença de linfócitos Th17 está associada com formas brandas em camundongos e humanos (FELONATO *et al*, 2012; DE CASTRO *et al*, 2013; DE CASTRO *et al*, 2018).

Especificamente, Tristão *et al.*, 2017 avaliaram a resposta imune dependente de Th17 e o papel das citocinas associadas à sua diferenciação (IL-6 e IL-23) e ação efetora (IL-17A) durante a PCM experimental. O *P. brasiliensis* induziu a produção de IL-17A *in vitro* e todas as citocinas associadas a Th17 no tecido pulmonar de camundongos. Além disso, a deficiência de IL-6, IL-23 ou do receptor IL-17 (IL-17RA) prejudicou a formação compacta de granuloma e conferiu suscetibilidade durante a infecção, associada à redução de TNF- α , IFN- γ e expressão do gene que codifica a óxido nítrico sintase (*iNOS*). Ademais, demonstraram que a produção de IL-6 por macrófagos é importante para promover a diferenciação de Th17 durante a infecção pelo *P. brasiliensis*. De fato, a transferência adotiva de macrófagos derivados de medula de camundongos selvagens para aqueles deficientes para IL-6 ou IL-17RA infectados reduziu a carga fúngica nos pulmões em comparação com camundongos não transferidos e restabeleceu a formação de granuloma pulmonar. Em conjunto, estes resultados sugerem que as citocinas associadas a Th17 estão envolvidas na modulação da resposta imune e na formação de granuloma durante a PCM experimental.

Nossos resultados apontam que o tratamento de Zymosan ou PAM3CSK4 em BMDCs co-cultivadas com esplenócitos polariza os linfócitos para essas populações Th1 e Th17 consideradas protetoras na PCM. Uma aparente contradição, porém, permanecia. Como seria induzido a diferenciação da subpopulação Th1 na ausência da produção pelas BMDCs da principal citocina responsável por esse processo (IL-12p70). Nesse sentido a secreção de IL-18 e IL-27 por BMDCs infectadas tratadas com Zymosan e PAM3CSK4 foram avaliadas (Figura 11), por estarem relacionadas com a indução da produção de IFN- γ por linfócitos T e outros leucócitos. De fato, observamos uma produção significativa dessas citocinas quando com o tratamento

com os agonistas de PRRs, sugerindo que a diferenciação induzida para um perfil predominante Th1 em linfócitos co-cultivados com BMDCs infectadas pelo fungo poderia ocorrer de forma independente ou parcialmente independente de IL-12p70. IL-18 é capaz de induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T, além da proliferação dessas células, de forma independente de IL-12, sendo mais uma citocina regulatória da diferenciação de linfócitos (OKAMURA *et al*, 1995). E além de IL-12p70 e IL-18 desenvolverem atividades semelhantes, sinergicamente, mas de forma independente uma da outra, suas vias de regulação de transcrição também diferem (KOHNO *et al*, 1997; YANG *et al*, 2001), o que indica que o mesmo fator inibitório de uma delas, pode não agir sobre a outra.

O papel de IL-18 na resistência a infecção experimental por *P. brasiliensis* foi recentemente descrito. Assim como IL-1 β , a produção de IL-18 é dependente do inflamassoma NLRP3 e caspase-1. Animais deficientes para essas proteínas são mais suscetíveis a infecção, sendo o efeito protetor mediado pela IL-18, como por exemplo sugerido pelos altos níveis de carga fúngica nos animais que não produzem essa citocina.

Interessantemente, o efeito protetor estava associado aos níveis aumentados de IFN- γ e de linfócitos produtores dessa citocina nos pulmões de animais selvagem quando comparado com aqueles deficientes para IL-18 (KETELUT-CARNEIRO *et al*, 2015).

IL-27, por sua vez, atua inibindo GATA3, um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento de linfócitos Th2, que inibe a diferenciação de linfócitos Th1. Além disso, estimula T-bet, um fator de transcrição imprescindível para o desenvolvimento de linfócitos com perfil Th1. Apesar de sozinha não induzir a produção de IFN- γ tão bem quanto IL-18, e necessitar de IL-12p70 para isso, IL-27 influencia nesses fatores de transcrição e age mediando a responsividade dos linfócitos a IL-12p70 (LUCAS *et al*, 2002; PFLANZ *et al*, 2002; TAKEDA *et al*, 2003).

Os resultados obtidos *in vitro* nos levou a avaliação do potencial uso de BMDCs tratadas *ex vivo* com zymosan como terapia na infecção experimental por *P. brasiliensis*. A escolha do zymosan como estímulo recai na sua conhecida capacidade de ativar não só dectina-1 como TLR2. É sabido que a associação de PRRs heterólogos aumenta sinergicamente sua intensidade de sinal. Em particular, dectina-1 e TLR2 se associam fisicamente e sinergizam para aumentar as respostas

antifúngicas (Gantner et al., 2003; Dennehy et al., 2008; Ferwerda et al., 2008). A co-localização de TLR2 e dectina-1 na sinapse fagocitária que envolve o zimosan na membrana dos fagócitos é relatada (Brown et al., 2003). Interessantemente, o zimosan não ativa o NFκB quando as células expressam somente TLR2 ou dectina-1 sozinha; no entanto, a co-expressão de TLR2 e dectina-1 permite que o zimosan ative NFκB (Gantner et al., 2003), sugerindo a importância da sinergia de PRR. A sinergia de dectina-1 e TLR2 foi também demonstrada em macrófagos derivados de monócitos humanos por meio da produção aumentada de TNF-α quando co-estimulados com curdlan (ligante de dectina-1) e Pam3Cys (ligando de TLR2) (FERWERDA *et al.*, 2008).

A Figura 12 mostra os resultados iniciais dessa avaliação na forma da quantificação da carga fúngica. O tratamento com BMDCs estimuladas com zimosan em camundongos infectados com *P. brasiliensis* pela via intranasal levou a redução drástica da viabilidade fúngica nos pulmões e baço. Esse resultado sugere que o tratamento é efetivo em evitar a proliferação fúngica no local da infecção e também sua disseminação. Os estudos englobando a avaliação histopatológica, quantificação de citocinas no lavado broncoalveolar, avaliação fenotípica de leucócitos infiltrados e curva de sobrevivência vão complementar nossos achados e estabelecer o mecanismo associado a efetividade dos camundongos tratados com BMDCs mais zimosan em eliminar o fungo.

O uso de β-glucana (principal componente do zimosan) como agente terapêutico associado as drogas antifúngicas ou como vacina é explorado em infecções fúngicas. Como já citado, a administração intravenosa de β-glucana em pacientes portadores de PCM grave mostrou grande progresso clínico associado a uma maior produção de TNF-α (MEIRA *et al.*, 1996). Além disso, β-1,3-glucana também foi utilizada com sucesso associada a itraconazol, fármaco antifúngico, em caso de cromoblastomicose causada por *F. pedrosoi*. (AZEVEDO *et al.*, 2007).

No caso de vacinas, o uso de partículas de β-glucana derivadas da parede de *S. cerevisiae* para esse fim leva a proteção contra infecção pelos fungos *Coccidioides posadasii* e *A. fumigatus* (CLEMONS et al., 2014; 2015). O mecanismo de proteção gerado para *A. fumigatus* estava associado a ativação efetiva da resposta imunológica inata e adaptativa como mostrado na produção de citocinas

como INF- γ , TNF- α , quimiocinas (MCP-1, MIP-1a, RANTES, KC) e citocinas associadas a resposta Th17 (IL-6, IL-1b, IL-17) (CLEMONS et al., 2014).

6 - Conclusão

O uso de agonistas de PRRs na infecção de BMDCs *in vitro* com *P. brasiliensis* se mostra promissor como, por exemplo, para seu uso em terapias adjuvantes contra essa micose, pois em diversos aspectos melhora as atividades da principal célula associada a indução da resposta imunológica adaptativa.

Foi visto que Zymosan e Pam3csk4 são capazes de induzir o aumento da produção de citocinas da imunidade inata, como IL-6, TNF- α e IL-1 β , que participam de processos importantes na proteção contra infecção por *P. brasiliensis*. Os agonistas ainda se mostram interessantes pela sua capacidade de modular o perfil de imunidade adaptativa gerado, reduzindo a produção das citocinas características do perfil de linfócitos Th2, IL-13, e aumentando a produção daquelas citocinas relacionadas com linfócitos Th1 e Th17, IFN- γ e IL-17, respectivamente. E que isso se dá pelo aumento da produção de IL-18 e IL-27 induzido pelo estímulo com agonistas, pois essas são citocinas que também estão relacionadas com a polarização da resposta para Th1.

Ainda foi observada a capacidade do *P. brasiliensis* de inibir a citocina IL-12p70 e foi mostrada que tal inibição ocorre na transcrição da subunidade p35 da citocina. Apesar de não se saber o mecanismo pelo qual o fungo realiza a inibição, foi mostrado também que apesar de o contato ser necessário para esse processo, ele não se dá via receptores Mincle, Dectina-1, Dectina-2, Dectina-3, TLR-2 e TLR-4.

A análise da imunomodulação *in vivo* iniciou promissora, já que essa vacina terapêutica com DCs estimuladas por Zymosan se mostrou capaz de reduzir a carga fúngica dos pulmões e baços dos camundongos tratados.

7 – Referências Bibliográficas

AKIRA, Shizuo. The role of IL-18 in innate immunity. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 1, p. 59-63, 2000.

ARRUDA, Celina et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clinical Immunology**, v. 103, n. 2, p. 185-195, 2002.

AZEVEDO, E. Silva et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 341-344, 2008.

BANCHEREAU, Jacques et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BOCCA, Anamelia L. et al. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 2, p. 280-287, 1999.

BORGES-WALMSLEY, M. Ines et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

CALICH, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British journal of experimental pathology**, v. 66, n. 5, p. 585, 1985.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.

CALICH, Vera Lúcia Garcia et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-236, 2008.

CALICH, Vera LG; MAMONI, Ronei L.; LOURES, Flávio V. Regulatory T cells in paracoccidioidomycosis. **Virulence**, p. 1-12, 2018.

CAMACHO, Emma; NIÑO-VEGA, Gustavo A. *Paracoccidioides* spp.: virulence factors and immune-evasion strategies. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.

CANO, Luz E. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection and immunity**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, 1995.

CANO, Luz E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.

CASADEVALL, Arturo. Evolution of intracellular pathogens. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 19-33, 2008.

CARDOSO, Rhanderson Miller Nascimento et al. The relation between FoxP3+ regulatory T cells and fungal density in oral paracoccidioidomycosis: a preliminary study. **Mycoses**, v. 57, n. 12, p. 771-774, 2014.

COLOMBO, Arnaldo Lopes et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical mycology**, v. 49, n. 8, p. 785-798, 2011.

CONTI, Heather R. et al. Oral-resident natural Th17 cells and $\gamma\delta$ T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 10, p. 2075-2084, 2014.

COUTINHO, Ziadir Francisco et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

DE ALMEIDA, Sergio Monteiro et al. Geographical evaluation of Neuroparacoccidioidomycosis and Paracoccidioidomycosis in Southern Brazil. **Mycoses**, 2018.

DE CASTRO, Lívia Furquim et al. NLRP3 inflammasome is involved in the recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* by human dendritic cells and in the induction of Th17 cells. **Journal of Infection**, 2018.

DE OLIVEIRA, Haroldo C. et al. Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1319, 2015.

DENNEHY, Kevin M. et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. **European journal of immunology**, v. 38, n. 2, p. 500-506, 2008.

DENNEHY, Kevin M. et al. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. **European journal of immunology**, v. 39, n. 5, p. 1379-1386, 2009.

DA GLÓRIA SOUSA, Maria et al. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 5, p. 436-443, 2011.

DA PAZ, Giselle S. et al. Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides brasiliensis* in bats collected in urban areas. **Transboundary and emerging diseases**, 2018.

DA SILVA, Silvana Petrofeza et al. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1039-1050, 1999.

DE ARRUDA, José Alcides Almeida et al. A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: Analysis of 320 cases and literature review. **Oral diseases**, v. 24, n. 8, p. 1492-1502, 2018.

DE CASTRO, Livia Furquim et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 470-485, 2013.

DE OLIVEIRA, Haroldo C. et al. Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

DINIZ, Susana N. et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Human immunology**, v. 62, n. 8, p. 799-808, 2001.

DOS SANTOS, Suelen Silvana; FERREIRA, Karen Spadari; ALMEIDA, Sandro Rogerio. Paracoccidioides brasiliensis-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19690, 2011.

ERWIG, Lars P.; GOW, Neil AR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163-176, 2016.

FELONATO, Maíra et al. Anti-CD25 treatment depletes Treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e51071, 2012.

FERIOTTI, Claudia et al. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

FERIOTTI, Claudia et al. NOD-like receptor P3 inflammasome controls protective Th1/Th17 immunity against pulmonary paracoccidioidomycosis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 786, 2017.

FERREIRA, Karen Spadari; LOPES, José Daniel; ALMEIDA, Sandro Rogério. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology letters**, v. 94, n. 1, p. 107-114, 2004.

FERWERDA, Bart et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 18, p. 1760-1767, 2009.

GRAHAM, Lisa M. et al. The C-type lectin receptor CLECSF8 (CLEC4D) is expressed by myeloid cells and triggers cellular activation through Syk kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 31, p. 25964-25974, 2012.

GUBLER, Ueli et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 10, p. 4143-4147, 1991.

GLOCKER, Erik-Oliver et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 18, p. 1727-1735, 2009.

HAMZA, Therwa; BARNETT, John B.; LI, Bingyun. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 3, p. 789-806, 2010.

HARDISON, Sarah E.; BROWN, Gordon D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nature immunology**, v. 13, n. 9, p. 817-822, 2012.

HUNG, Chiung-Yu et al. Vaccine immunity to coccidioidomycosis occurs by early activation of three signal pathways of T helper cell response (Th1, Th2 and Th17). **Infection and immunity**, p. IAI. 05726-11, 2011.

KASHINO, Suely Sanae et al. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, n. 3, p. 173-178, 1985.

KETELUT-CARNEIRO, Natália et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. **The Journal of Immunology**, p. 1402321, 2015.

KERSCHER, Bernhard et al. Mycobacterial receptor, Clec4d (CLECSF8, MCL), is coregulated with Mincle and upregulated on mouse myeloid cells following microbial challenge. **European journal of immunology**, v. 46, n. 2, p. 381-389, 2016.

KOHNO, Keizo et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 4, p. 1541-1550, 1997.

KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Pathogen recognition by the innate immune system. **International reviews of immunology**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

LEE, Pamela P.; LAU, Yu-Lung. Cellular and molecular defects underlying invasive fungal infections—revelations from endemic mycoses. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 735, 2017.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, Salomé; WÜTHRICH, Marcel; HOHL, Tobias M. Immunity to fungi. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 4, p. 449-458, 2012.

LEMOINE, Sébastien et al. Dectin-1 activation unlocks IL12A expression and reveals the T H 1 potency of neonatal dendritic cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 5, p. 1355-1368. e15, 2015.

LINO, Cleudiomar Inácio et al. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 151, p. 248-260, 2018.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOURES, Flávio V. et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1279-1290, 2009.

LOURES, Flávio V. et al. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+ IL-17+ cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 762-773, 2014.

LUCAS, Sophie et al. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and-independent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15047-15052, 2003

LUTZ, Manfred B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of immunological methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.

MAGALHÃES, A. et al. Prophylactic and therapeutic vaccination using dendritic cells primed with peptide 10 derived from the 43-kilodalton glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 23-29, 2012.

MARTINEZ, Roberto. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MCGREAL, Eamon P. et al. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. **Glycobiology**, v. 16, n. 5, p. 422-430, 2006.

MEIRA, Domingos Alves et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 5, p. 496-503, 1996.

NAKANISHI, Kenji et al. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 12, n. 1, p. 53-72, 2001.

OKAMURA, Haruki et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. **Nature**, v. 378, n. 6552, p. 88-91, 1995.

OPPMANN, Birgit et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715-725, 2000.

PAGLIARI, Carla et al. Revisiting Langerhans cells in paracoccidioidomycosis: expression of CD207/langerin in human cutaneous and mucosal lesions. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12, p. 1012-1017, 2011.

PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18026, 2018.

PFLANZ, Stefan et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 779-790, 2002.

PINTO, Aguinaldo R. et al. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 18, n. 26, p. 3050-3058, 2000.

PREITE, Nycolas Willian et al. The syk-coupled c-Type lectin receptors Dectin-2 and Dectin-3 are involved in *Paracoccidioides brasiliensis* recognition by human Plasmacytoid Dendritic cells. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 464, 2018.

PUCCIA, Rosana et al. The *Paracoccidioides* cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 257, 2011.

RIBEIRO, Giselle Ferreira et al. Autophagy in *Paracoccidioides brasiliensis* under normal mycelia to yeast transition and under selective nutrient deprivation. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0202529, 2018.

ROBINSON, Matthew J. et al. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 9, p. 2037-2051, 2009.

RODRIGUES-VENDRAMINI, Franciele Abigail Vilugron et al. Promising new antifungal treatment targeting chorismate synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 01097-18, 2018.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 11-24, 2004.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275, 2011.

ROY, Rene M.; KLEIN, Bruce S. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. **Cell host & microbe**, v. 11, n. 5, p. 436-446, 2012.

SAID, André; WEINDL, Günther. Regulation of dendritic cell function in inflammation. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

SAIJO, Shinobu et al. Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 681-691, 2010.

SATO, Kota et al. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor γ chain to induce innate immune responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38854-38866, 2006.

SIEBURTH, D. et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. **Genomics**, v. 14, n. 1, p. 59-62, 1992.

SILVA FERREIRA, Cyntia et al. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. **Future microbiology**, v. 11, n. 7, p. 973-985, 2016.

SOUTO, Janeusa T. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 5, p. 1811-1820, 2000.

SOUTO, Janeusa T. et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **The American journal of pathology**, v. 163, n. 2, p. 583-590, 2003.

TABORDA, Carlos et al. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 21-24, 2015.

TAKEDA, Atsunobu et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 4886-4890, 2003.

TAVARES, Aldo Henrique. et al. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1459, 2012.

TAVARES, Aldo Henrique et al. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2595, 2013.

TAVARES, Aldo Henrique; BÜRGE, Pedro Henrique; BOCCA, Anamélia Lorenzetti. Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 7, p. e1004948, 2015.

TAYLOR, Philip R. et al. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. **Nature immunology**, v. 8, n. 1, p. 31-38, 2007.

TRAVASSOS, Luiz R.; TABORDA, Carlos P. *Paracoccidioidomycosis* vaccine. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 8, n. 10, p. 1450-1453, 2012.

THIND, Sharanjeet K.; TABORDA, Carlos P.; NOSANCHUK, Joshua D. Dendritic cell interactions with *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 424-432, 2015.

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

VÁZQUEZ, CAROLINA et al. Diagnóstico oportuno de paracoccidioidomicosis diseminada en un adulto inmunocompetente. **MEDICINA (Buenos Aires)**, v. 78, n. 3, p. 199-202, 2018.

WANKE, Bodo; AIDÉ, Miguel Abidon. Capítulo 6-Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, 2009.

WEVERS, Brigitte A. et al. Fungal engagement of the C-type lectin mincle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 4, p. 494-505, 2014.

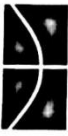
WILLIAMSON, Geordie. The Hodge theory of the Decomposition Theorem (after de Cataldo and Migliorini). **arXiv preprint arXiv:1603.09235**, 2016.

WOLF, STANLEY F. et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 9, p. 3074-3081, 1991.

WÜTHRICH, Marcel; DEEPE JR, George S.; KLEIN, Bruce. Adaptive immunity to fungi. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 115, 2012.


YANG, Jianfei et al. IL-18–stimulated GADD45 β required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN- γ production. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 157-164, 2001.

ZHU, Le-Le et al. C-type lectin receptors Dectin-3 and Dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 324-334, 2013.




Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal


Brasília, 13 de outubro de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "Uso Terapêutico de Agonistas de Receptores de Reconhecimento Padrão NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE MURINA.", UnBDoC n.º 117971/2014, sob responsabilidade do Professor Aldo Henrique Fonseca e Tereza Tavares foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Scanned by CamScanner